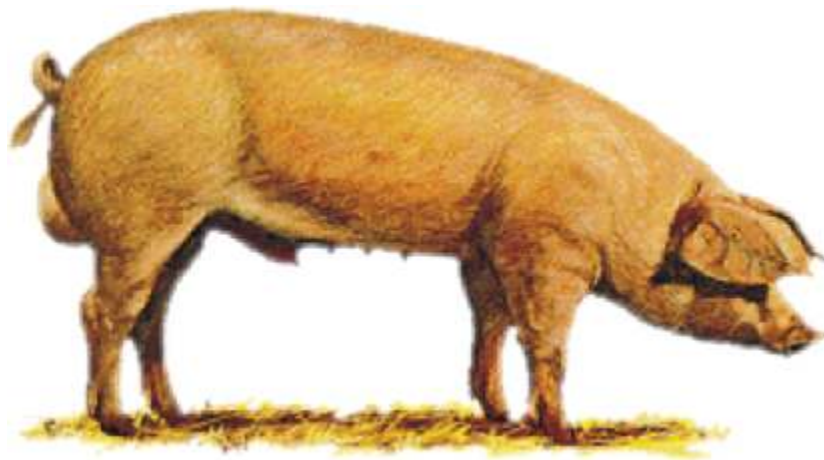


# Untersuchungen zur testikulären Steroidhormonproduktion beim Eber und der Aktivität der Enzyme Östrogensulfotransferase und Arylsulfatase C in Hoden und Nebenhoden

ANJA ROSTALSKI



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit  
Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

**Untersuchungen zur testikulären Steroidhormonproduktion beim  
Eber und der Aktivität der Enzyme Östrogensulfotransferase  
und Arylsulfatase C in Hoden und Nebenhoden**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Anja Rostalski**

Tierärztin aus Köln

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2005

mit besonderem Dank

an

meine Mutter

Käthe Rostalski

† 20.04.2005



1	Einleitung:.....	4
2	Literaturübersicht.....	6
2.1	Testikuläre Östrogene, allgemeine Aspekte.....	6
2.2	Synthesewege testikulärer Östrogene .....	8
2.2.1	Ontogenese der Sexualhormonproduktion beim männlichen Hausschwein.....	9
2.2.2	Konjugierte Steroidhormone und ihre Funktion .....	10
2.2.3	Cytochrom P450 Aromatase, Östrogensulfotransferase und Arylsulfatase C .....	11
2.2.3.1	Cytochrom P450 Aromatase .....	11
2.2.3.2	Östrogensulfotransferase (OST) .....	13
2.2.3.3	Arylsulfatase C (ASC) .....	15
2.2.4	Beteiligung der akzeßorischen Geschlechtsdrüsen am Steroidmetabolismus .....	17
2.2.5	Östrogengehalte in Sekreten des Genitaltraktes beim Eber .....	18
2.2.5.1	Tubuli seminiferi und Nebenhoden.....	18
2.2.5.2	Ejakulat .....	18
2.2.6	Lokalisation der testikulären Östrogenproduktion.....	20
2.2.6.1	Leydig-Zellen.....	20
2.2.6.2	Sertoli-Zellen .....	22
2.3	Der Nebenhoden .....	23
2.3.1	Aufbau und Funktion des Nebenhodens .....	23
2.3.2	Verstoffwechselung von Steroidhormonen im Nebenhoden .....	24
2.4	Zielsetzung der eigenen Untersuchungen .....	25
3	Eigene Untersuchungen .....	26
3.1	Tiermaterial und Probenentnahme .....	26
3.2	Präparation des Gewebes .....	29
3.2.1	Vorzerkleinerung .....	29
3.2.2	Herstellung der Homogenate .....	30
3.3	Erfassung der Sulfatase- und Sulfotransferase-Aktivität .....	30
3.3.1	Prinzip der Enzymbestimmung .....	30
3.3.2	<sup>3</sup> H-markierte Substratlösungen .....	30
3.3.3	Kontrollproben .....	31
3.3.4	Inkubationsansätze mit Homogenat .....	31
3.3.5	Extraktion und Erfassung von freiem <sup>3</sup> H-Estron .....	31
3.3.6	Extraktion und Erfassung von <sup>3</sup> H-Estronsulfat .....	32
3.3.7	Auswertung der Ergebnisse .....	32

3.3.8	Statistische Auswertung .....	33
3.4	Steroidanalytik in Blut- und Seminalplasma .....	34
3.4.1	Radioimmunologische Bestimmungsverfahren .....	34
3.4.2	Angaben zur Durchführung der einzelnen RIA`s .....	36
3.4.2.1	Bestimmung von Estron .....	36
3.4.2.2	Bestimmung von Estronsulfat .....	37
3.4.2.3	Bestimmung von Testosteron .....	38
3.4.2.4	Bestimmung von Progesteron .....	38
3.4.2.5	Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$ und Estron nach Auftrennung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	39
3.5	Liste der eingesetzten Chemikalien, Materialien, Geräte und Pufferlösungen .....	40
3.5.1	Chemikalien .....	40
3.5.2	$^3\text{H}$ -markierte Steroide .....	40
3.5.2.1	$^3\text{H}$ -Substrate für die Bestimmung der Enzymaktivitäten .....	40
3.5.2.2	$^3\text{H}$ -markierte Steroide für die Hormonbestimmungen mittels RIA .....	41
3.5.3	Materialien und Geräte .....	41
3.5.4	Eingesetzte Pufferlösungen .....	42
4	Ergebnisse .....	44
4.1	Hormonbestimmungen .....	44
4.1.1	Ergebnisdarstellung in Abhängigkeit vom Alter und Entnahmeort der Blutprobe ..	44
4.1.1.1	Hormonkonzentrationen im peripheren Blut .....	44
4.1.1.2	Hormonkonzentrationen in der Arteria testicularis .....	46
4.1.1.3	Hormonkonzentrationen in der Vena testicularis .....	48
4.1.2	Gegenüberstellung der im peripheren Blut und der testikulären Zirkulation gemessenen Hormonwerte .....	51
4.1.3	Hormonkonzentrationen im Seminalplasma geschlechtsreifer Eber .....	54
4.2	Nach der „High Performance Liquid Chromatography (HPLC)“ ermittelte Konzentrationen an freiem und konjugiertem Estradiol-17 $\beta$ und Estron in Blut und Seminalplasma geschlechtsreifer Eber .....	56
4.3	Tastversuche zur Erfassung der Östrogensulfotransferase (OST) und der Arylsulfatase C (ASC) -Aktivität .....	58
4.3.1	Untersuchungen zur Aktivität der Östrogensulfotransferase (OST) in Gewebehomogenaten von Hoden und Nebenhoden .....	58
4.3.1.1	Untersuchungen ohne Zusatz des Cofaktors .....	58



4.3.1.2	Untersuchungen nach Zusatz des Cofaktors PAPS (3'Phosphoadenosin-5'Phosphosulfat) .....	60
4.3.1.3	Weiterführende Untersuchungen zur OST-Aktivität im Nebenhoden.....	62
4.3.2	Untersuchungen zur Aktivität der Arylsulfatase C (ASC) in Gewebekomogenaten von Hoden und Nebenhoden.....	63
4.3.3	Untersuchungen zur Stabilität von OST und ASC.....	65
5	Diskussion.....	66
5.1	Diskussion der Methodik .....	66
5.1.1	Versuchsaufbau .....	66
5.1.2	Radioimmunologische Hormonanalytik .....	66
5.1.3	Bestimmung von OST und ASC.....	67
5.1.3.1	Verwendung von Gewebekomogenaten .....	67
5.1.3.2	Arylsulfatase C.....	68
5.1.3.3	Östrogensulfotransferase.....	68
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	69
5.2.1	Steroidhormone im Blut- und Seminalplasma .....	69
5.2.2	Östrogensulfotransferase (OST) und Arylsulfatase C (ASC) .....	72
6	Zusammenfassung.....	75
7	Summary .....	77
8	Literaturverzeichnis .....	79
9	Tabellenanhang.....	107
10	Danksagung.....	119



# 1 EINLEITUNG

Die Bedeutung der testikulären Östrogenproduktion musste lange Zeit als biologisch ungeklärt eingestuft werden. Dies gilt insbesondere für das Schwein, wo die im Blut von Ebern vorkommenden Östrogenkonzentrationen die Werte bei weiblichen Tieren weit übersteigen. Eine Bedeutung dieser Östrogene für die Reproduktion wurde erstmals von Claus et al. (1987) postuliert, die den in der Samenflüssigkeit enthaltenen Östrogenen eine Steigerung der myometrialen Kontraktilität und eine Synchronisation der Ovulationsinduktion bei der Kopulation zuschreiben.

Im Hinblick auf den Eber selbst konnten Joshi und Raeside (1973) sowie Booth (1983a) das typische Paarungsverhalten des Ebers sowie die Ausbildung und Sekretionsleistung der akzeßorischen Geschlechtsdrüsen den Östrogenen zuordnen. Auch die Fähigkeit zur Kopulation ergab sich bei Börgen erst nach Verabreichung einer Kombination der Androgene Testosteron und Dehydroepiandrosteron mit dem Östrogen Estron. Belegt ist dieser Androgen-Östrogen-Synergismus auch bei anderen Tierarten, wie Schaf (D'Occhio und Brooks, 1980), Kaninchen (Toney und Danzo, 1989) und Ratte (Dhar et al., 1998). Bei der Ratte beeinflussen Östrogene und Androgene gemeinsam Wachstum und Entwicklung des Nebenhodens (Dhar et al., 1998). Beim Hund kann durch die alleinige Gabe von Östradiolbenzoat eine deutliche Nebenhodenhyperplasie bei männlichen Welpen (Connell und Donjacour, 1985) erzielt werden.

Die Bedeutung von Östrogenen für die männliche Reproduktion ergibt sich insbesondere aber auch aus neueren Untersuchungen von Hess et al. (1997), die bei der Ratte die Expression der Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  im Hoden- und Nebenhoden nachweisen konnten; beim Fehlen dieser Rezeptoren trat Infertilität ein.

Unbeschadet dieser Beobachtungen werden in der öffentlichen Diskussion - insbesondere im Hinblick auf die Wirkung östrogen-wirksamer Xenobiotika (endocrine disrupters) - Östrogene als eher inkompatibel mit der männlichen Fortpflanzung angesehen. Dem steht entgegen, dass Tiere wie der Eber oder auch der Hengst, trotz ihrer gewaltigen Östrogenproduktion, eine besonders hohe Spermatogeneseleistung aufweisen.

Ziel vorliegender Untersuchungen war es daher, weitere Angaben zur Charakterisierung der Produktion testikulärer Östrogene und deren Verteilung im Organismus zu erhalten.

Durch Erfassung der Aktivität der beiden Enzyme Östrogensulfotransferase (OST) und Arylsulfatase C (ASC) im Hoden und Nebenhoden des Ebers sollten darüber hinausgehend Informationen erhalten werden, inwieweit durch Aktivierung bzw. Inaktivierung von Estron, nachgeordnet zu dessen Synthese, die Verfügbarkeit geregelt werden kann.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Testikuläre Östrogene, allgemeine Aspekte

Das Vorkommen von Östrogenen bei den männlichen Haustieren ist seit langem bekannt; bereits Hauer (1933) und Küst (1934) berichteten von ihrem Vorkommen im Urin bei Eber und Hengst und zogen schon früh Schlüsse über deren testikulären Ursprung. Velle (1958a) bestimmte für den Eber Exkretionsraten von 1595 µg Estron und 850 µg Estradiol pro Liter Harn, wobei er die erfassten Östrogene vor allem als ätherunlösliche Konjugate identifizierte (Velle, 1958b). Raeside (1969) extrahierte 240 µg sulfatierte und nur 1,7 µg freie Östrogene aus Testisgewebe eines gesunden Hengsthodens.

Im Blutplasma des Ebers lassen sich Östrogene in jeder Altersstufe messen, wobei Estronsulfat (E1S) in jeder Phase über freies Estron (E1) und Estradiol-17β (E2) dominiert (Ford, 1983a). Dass ihre Bildung unmittelbar dem Hoden zuzuschreiben ist, zeigen die deutlich höheren Konzentrationen an Östrogenen und Androgenen in Hodenlymphe und der Vena testicularis im Vergleich zum peripheren Blut. Im Vergleich dazu wurden nur sehr geringe Steroidkonzentrationen in der Rete testis-Flüssigkeit gemessen, woraus Setchell et al. (1983) auf einen selektiven Transportmechanismus für Steroide schließen. Der Hengst zeigt im Gegensatz zum Eber nur bei den Konjugaten die Tendenz zur Konzentration in der Lymphe (Setchell und Cox, 1982).

Tab. 1: Angaben aus der Literatur über Östrogengehalte im peripheren Blut bei männlichen Haustieren und beim Mann (alle Angaben in nmol/l)

Spezies	E1	E1S	E2 $\beta$	Quelle
<b>Pferd</b>	0,54 $\pm$ 0,15			Inoué et al. 1993
		342,57		Silberzahn et al. 1988
	0,43	197,22 $\pm$ 13,68		Raeside 1979
		712,50		Setchell 1982
			0,37 $\pm$ 0,03	Wichmann et al. 1984
			0,007 $\pm$ 0,03	v.d.Molen et al. 1981
	0,53 (1,21) $\bar{X}_g^*(DF)$	420 (1,44) $\bar{X}_g^*(DF)$	0,11 (1,16) $\bar{X}_g^*(DF)$	Hoffmann und Landeck 1999
		184,40-437,48		Raeside und Christie 1997
<b>Schwein</b>	0,74 $\pm$ 0,07			Seamans et al. 1991
	0,44 $\pm$ 0,0003 bis 4,59	1,08 $\pm$ 0,60 bis 91,20		Schopper et al. 1984
<b>Rind</b>			0,32 $\pm$ 0,08	Wichmann et al. 1984
	0,37 bis 0,79			Juniewicz und Johnson 1980
			0,17 $\pm$ 0,06	Wichmann et al. 1984
			0,06 $\pm$ 0,03	Hartl 1990
<b>Schaf</b>			0,02 $\pm$ 0,001	(alte und junge Bullen)
			0,29 $\pm$ 0,16	Wichmann et al. 1984
			<0,004	Schanbacher und Ford 1976
<b>Hund</b>		0,13 $\pm$ 0,04		Riesenbeck et al. 1999
			0,08 $\pm$ 0,04	Wichmann et al. 1984
			0,03 $\pm$ 0,003	Kelch et al. 1972
			<0,01	Lukesch 1992
			0,04	Riesenbeck et al. 1999
<b>Mensch</b>	2,48 $\pm$ 0,88	0,18 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,05	Wu et al. 1982
		0,21 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,02	Baird et al. 1973
			0,07 $\pm$ 0,006	Kelch et al. 1972
	0,23 $\pm$ 0,03		0,09 $\pm$ 0,008	Weinstein et al. 1974

Dass es sich bei der testikulären Östrogenproduktion, wie von Silberzahn et al. (1988) beim Hengst vermutet, alleine um eine aromatasevermittelte Regulation des Androgengehaltes im Blut handelt, erscheint beim Schwein aufgrund der beschriebenen Effekte im weiblichen Genitale allerdings nicht plausibel. Eine Übersicht über bisher in der Literatur erschienene Angaben zu Östrogenkonzentrationen im peripheren Blut von männlichen Haustieren und dem Mann gibt Tabelle 1.

## 2.2 Synthesewege testikulärer Östrogene

Ausgehend von Cholesterin ist das C21-Steroid Pregnenolon das eigentliche Ausgangssubstrat für die Bildung aller weiteren Steroidhormone. Cholesterin wird in den Zellen als Lipidtropfen gespeichert; es wird über Plasmalipoproteine in die Zelle geschleust, kann dort aber auch de novo aus Acetat synthetisiert werden. Durch enzymatische Abspaltung der Seitenkette entsteht das Pregnenolon (P5), abhängig von der Enzymausstattung der Zelle werden im weiteren Verlauf Gestagene (C21-Steroide), Androgene (C19-Steroide) und Östrogene (C18-Steroide) produziert.

Abbildung 1 zeigt die möglichen Synthesewege für Androgene und Östrogene und die daran beteiligten Enzyme. Nicht jede Spezies verfügt über die gleichen Voraussetzungen. So wiesen Bedrak und Samuels (1969) für den Hengst primär den  $\Delta 4$ -Syntheseweg nach, nach Wichmann et al. (1984) hingegen spielt nicht nur bei Rind, Schaf, Schwein und Kaninchen, sondern auch beim Pferd der  $\Delta 5$ -Syntheseweg eine Rolle. Beim Eber konnten Raeside und Renaud (1983) beide Synthesewege bestätigen. Rothirsch, Hund, Katze, Ratte und Meerschweinchen bevorzugen eher den  $\Delta 4$ -Syntheseweg (Wichmann et al., 1984).

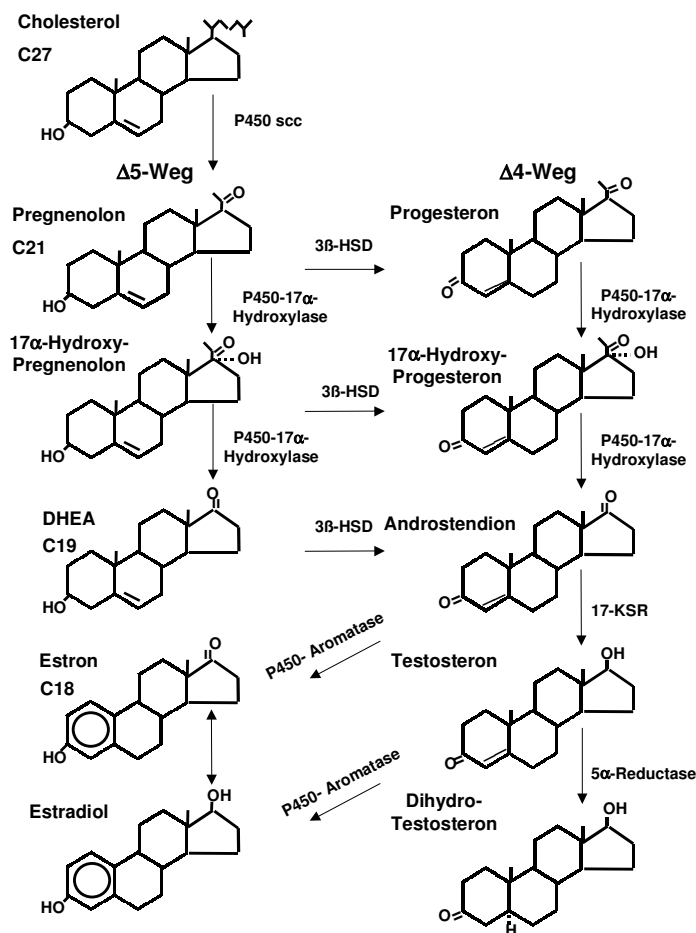


Abb. 1: Schema der Steroidbiosynthese (modifiziert nach Payne und O'Shaughnessy, 1996)

### 2.2.1 Ontogenese der Sexualhormonproduktion beim männlichen Hausschwein

Für die Geschlechtsdifferenzierung essentiell ist der frühe Einsatz der Androgensynthese im männlichen embryonalen/fetalen Organismus. Beim Embryo des Hausschweins erscheinen am 24. Tag der Gravidität die Gonaden beider Geschlechter morphologisch noch identisch, doch bereits zwei Tage danach wird die Differenzierung histologisch evident (Pelliniemi, 1975; 1976). Etwa zeitgleich setzt ausschließlich bei den männlichen Feten eine gonadale Sekretion von Testosteron ein (Moon et al., 1973), die bis zum 35. Graviditätstag ein Maximum erreicht (Raeside und Sigman, 1975; Ford et al., 1980), um dann wieder abzufallen (Stewart und Raeside, 1976).



Ein erneuter Anstieg der Androgensynthese erfolgt korrelierend mit dem Gonadenwachstum ab 5,1-5,3 cm fetaler Scheitel-Steiß-Länge (Raeside und Sigman, 1975), was nach Evans und Sack (1973) dem 40. bis 45. Tag post conceptionem entspricht.

Ab dem 33. Tag der Gravidität konnten auch bei männlichen Feten Östrogene, vor allem Estronsulfat, nachgewiesen werden; dabei ergab sich eine positive Korrelation zum Verlauf der Androgene (Raeside et al., 1993).

Nach der Geburt erfolgt beim Eber ein Anstieg der testikulären Androgene. Erste Höchstwerte werden im Alter zwischen 3 und 4 Wochen erreicht (Claus et al., 1971; Schwarzenberger et al., 1993).

Bei den während der ersten drei Lebenswochen ebenfalls angestiegenen Östrogenwerten findet zwischen Tag 12 und 21 post partum ein Abfall des freien Estradiol-17 $\beta$  um 50% statt, während sich zeitgleich die Estronsulfat-Werte verdoppeln (Ford, 1983a). Laut Ford (1983b) findet in diesem Zeitraum die sexuelle Prägung der männlichen Tiere statt.

Während des 2. bis 5. Lebensmonats verlaufen die Androgen- und Östrogenkonzentrationen dann wieder auf basalem Niveau; mit Eintritt in die Pubertät kommt es zu einem erneuten Anstieg, Gipfelwerte in der Androgen- wie Östrogenproduktion werden zwischen der 21.-24. Lebenswoche (Schwarzenberger et al., 1993) bzw. ab der 16. Lebenswoche (Ford, 1983a;b) erreicht.

Deutlich in allen untersuchten Altersstufen ist die Dominanz der sulfokonjugierten Formen, bei den Androgenen des Dehydroepiandrosteronsulfates (DHEAS), bei den Östrogenen des Estronsulfates.

### **2.2.2 Konjugierte Steroidhormone und ihre Funktion**

Das Anhängen von Glucuronid- oder Sulfatresten, allgemein als Konjugation bezeichnet, verändert nicht nur die physikochemischen Eigenschaften des Steroids von der Lipophilie hin zur Hydrophilie mit dem Effekt der verbesserten renalen Exkretion, sondern verhindert auch eine Bindung am klassischen Steroid-Rezeptor.

Hinsichtlich der Bildung von sulfatierten Steroiden lieferten Roberts et al. (1964) erstmals Hinweise, dass in vivo beim Menschen aus Cholesterinsulfat sulfatierte Gestagen- und Androgenmetaboliten entstehen. Gasparini et al. (1976) wiesen im Eberhoden die Umwandlung von Pregnenolonsulfat (P5S) in 17 $\alpha$ -OH-Pregnenolonsulfat und

Dehydroepiandrosteronsulfat nach. Nach Raeside (1982) können beim Eber sulfatierte Androgene wie Dehydroepiandrosteronsulfat und  $3\beta,17\beta$ -Dihydroxy-5-androsten-3-ol-sulfat nicht nur in Testosteron-, Estron- und Estradiolsulfat konvertiert werden, sondern auch in die jeweiligen freien Formen.

Der Versuch, mit Hilfe eines Aromatasehemmers die Östrogensynthese adulter Eber zu reduzieren, gelang nicht (Steinhauer, 1983). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die gesteigerte Mobilisation freier Östrogene aus „inaktiven“ sulfokonjugierten Formen durch eine bedarfsorientierte Sulfatase-Aktivität sein. Luu-Thé et al. (1996a) unterstellen dem Wechselspiel der Antagonisten Sulfatase/Sulfotransferase sogar größere Kapazitäten in der Bereitstellung freier Östrogene als dem klassischen Steroidsyntheseweg.

### **2.2.3 Cytochrom P450 Aromatase, Östrogensulfotransferase und Arylsulfatase C**

#### **2.2.3.1 Cytochrom P450 Aromatase**

Aromatase wird von praktisch allen Vertebraten in den Gonaden und im Gehirn exprimiert, wobei die cerebrale Biosynthese der Östrogene für die Ausprägung geschlechtstypischer Verhaltensweisen verantwortlich sein soll (Hutchinson, 1991).

Bei Menschen und Primaten liegt eine breite Gewebeverteilung der Aromatase vor; man findet sie in der Plazenta (Diczfalusy, 1964; Thompson und Siiteri, 1974; Inkster und Brodie, 1989), in adultem Fettgewebe (Grodin et al., 1973; Simpson et al., 1989), der Nebennierenrinde und in der Knochenwachstumszone (Öz et al., 2001; van der Eerden et al., 2002). Eine ausgeprägte plazentare Östrogensynthese wurde auch beim Pferd (Pashen und Allen, 1979; Gentz, 1994), Rind (Hoffmann et al., 1976; 1979; 1997), Schaf (Thompson und Wagner, 1974; Carnegie und Robertson, 1978), der Ziege (Sheldrick et al., 1980) und dem Schwein (Robertson und King, 1974) nachgewiesen. Speziell beim Pferd basiert eine Möglichkeit der hormongestützten Graviditätsdiagnostik auf dieser Östrogenproduktion (Gentz, 1994; Schuler, 1998).

Beim Schwein wurde die bereits bei 12 Tage alten Embryonen nachweisbare Aromatase-Aktivität und die daraus resultierende Östrogenproduktion als embryonales Signal zur Erkennung der Gravidität durch den maternalen Organismus (Umstellung von den Corpora

lutea cyclica zu den Corpora lutea graviditates) erkannt (Perry et al., 1973; Geisert et al., 1990).

Verschiedene Wege der Östrogensynthese wurden beschrieben. So wird das in der humanen Plazenta dominierende Estriol aus  $16\alpha$ -Hydroxydehydroepiandrosteronsulfat fetalen Ursprungs generiert, während im Fettgewebe aus Androstendion Estron und im Ovar aus Testosteron Estradiol synthetisiert wird (Baird, 1977).

Die Aromatase ist ein mikrosomal gelegener Enzym-Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Sie besteht aus einem Häm-Protein, das als Bindungsdomäne für die C19-Steroide fungiert, und katalysiert eine dreistufige Reaktionskette, die zur Formation des für die Östrogene charakteristischen phenolischen A-Ringes führt. An die Aromatase zusätzlich assoziiert ist ein Flavoprotein, eine NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, die Reduktionsäquivalente vom NADPH auf jede Form mikrosomaler Cytochrome übertragen kann.

Im Zuge der Aromatisierungsreaktion werden 3 Mol  $O_2$  und 3 Mol  $NADPH + H^+$  pro Mol C19-Steroid benötigt (Thompson und Siiteri, 1974). Beim Schwein existieren laut Conley et al. (1997) je nach Lokalisation verschiedene Isozyme, die sich in ihrer Aminosäuresequenz wie auch ihrer Funktion unterscheiden. Die plazentare Isoform der Aromatase besteht aus 503 Aminosäuren und gleicht der Aromatase anderer Säuger. Die ovarielle Isoform besitzt dagegen nur 501 Aminosäuren und eine um 80% geringere Enzymaktivität als die der Plazenta. Eine dritte Isoform, die beim Schwein bereits von 12 Tage alten Blastocysten exprimiert wird (s.o.), wechselt im Zuge der weiteren Differenzierung des Trophoblasten zum plazentaren Typus. In dieser Zeit wird auch die testikuläre und adrenale Expression der Aromatase im Schweinefetus evident. Untersuchungen am untranslatierten 5'-Ende der porcinen Aromatase-Isoformen mittels der RACE-PCR-Technik (= Rapid Amplification of the CDNA Ends-Polymerase Chain Reaction) haben gezeigt, dass die mRNAs der Aromatase in Hoden und Nebenniere sich an der untranslatierten Region des 5'-Endes gleichen, während zur ovariellen, plazentaren und Blastocysten-Isoform derart deutliche Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz dieses Abschnitts bestehen, dass von verschiedenen Promotoren ausgegangen wird.

Für den physiologischen Ablauf der Spermatogenese scheint die Aromatase speziesübergreifend essentiell zu sein; das haben die Untersuchungen an Aromatase-Knock-Out-Mäusen von Robertson et al. (1999) ebenso gezeigt, wie die Studien mit

Aromataseinhibitoren an Haubenlanguren (Shetty et al., 1998). Durch die gezielte Zerstörung des Cyp 19-Gens, das für die Expression der Aromatase zuständig ist, wurden initial normal fertile Mäuseriche produziert, die im weiteren Verlauf des Experiments eine progressiv gestörte Spermatogenese zeigten. Die Veränderungen konzentrierten sich im Bereich der frühen Spermiogenese in Form apoptotisch veränderter runder Spermatiden und vielkerniger Zellen. Die Elongation der Spermien fand teilweise nicht mehr statt, einige Tubuli seminiferi stellten die Spermiogenese komplett ein. Zum Teil waren Akrosomdefekte vorhanden, und alle Tiere zeigten eine Leydig-Zell-Hypertrophie bzw. -Hyperplasie. Im Nebenhodenschwanz war die Zahl sichtbarer Spermien generell reduziert, und es gelang auch keine Nachzucht mit diesen Tieren.

Eine signifikante Reduktion runder wie elongierter Spermatiden wurde unter Einsatz von Aromataseinhibitoren auch bei Haubenlanguren erreicht. Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass bei der Ratte und der Maus nicht nur die Leydig-Zellen, und - bei der jungen Ratte auch die Sertoli-Zellen -, sondern auch pachytäne Spermatozyten, runde wie elongierte Spermatiden und epididymale Spermien Aromatase exprimieren (Nitta et al., 1993; Janulis et al., 1996; Janulis et al., 1998).

### 2.2.3.2 Östrogensulfotransferase (OST)

Mit der Sulfatierung von Steroiden ist der Verlust ihrer biologischen Wirkung verbunden. Sulfotransferasen sind cytosolische Enzyme, die durch Aktivierung anorganischen Sulfates dazu in der Lage sind, dieses auf ein Empfänger-molekül zu übertragen. Bei den Säugern ist der Sulfat-Donor das 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat, welches in jeder Körperzelle gemäß dem Schema in Abbildung 2 synthetisiert werden kann (Holcenberg und Rosen, 1965):

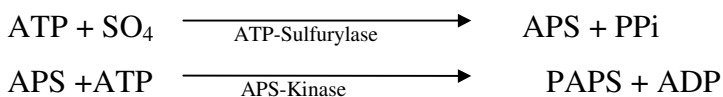


Abb. 2: 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) -Biosynthese

(ATP=Adenosintriphosphat; APS=Adenosinphosphosulfat;

ADP=Adenosindiphosphat; PPi=inorganisches Phosphat; SO<sub>4</sub>=Sulfat)

Somit limitiert nicht allein die Sulfotransferasenaktivität die Sulfatierungsrate sondern auch die Bioverfügbarkeit von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat.

Die Sulfotransferasen gehören einer heterogenen Familie von Isoenzymen an, die eine entfernte, jedoch gelegentlich überlappende Substratspezifität aufweisen. Unter ihnen nehmen die Steroid-Sulfotransferasen eine wichtige Rolle ein. So akzeptiert die Alkohol- oder Hydroxysteroid-Sulfotransferase (EC 2.8.2.2), wie auch die eigentliche Steroid-Sulfotransferase (EC 2.8.2.15), neben Hydroxysteroiden wie Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon, auch andere Substrate wie z.B. primäre und sekundäre Alkohole inklusive aliphatischer Alkohole, Ascorbinsäure, Chloramphenicol oder Ephedrin, jedoch keine phenolischen Steroide (Strott, 1996). Die Estron- (EC 2.8.2.4) und die Cortisol-Sulfotransferase (EC 2.8.2.18) interagieren ausschließlich mit der 3-Hydroxyl-Gruppe des Estrons bzw. der 21-Hydroxyl-Gruppe des Cortisols (Hobkirk, 1985) und werden zusammen mit der Phenol-Sulfotransferase unter dem Oberbegriff der Aryl-Sulfotransferasen zusammengefasst (Luu-Thé et al., 1996a,b).

OST-Aktivitäten konnten in zahlreichen Geweben (u.a. Leber, Gonaden, Nebenniere, Gehirn) nachgewiesen werden. Cooke et al. (1983) identifizierten in Leber und Hoden des Schweins unterschiedliche Hydroxysteroid-Sulfotransferasen für Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon, wobei deren Aktivität offensichtlich von dem Angebot freier wie konjugierter Hydroxysteroiden abhängt. Hohe OST-Aktivitäten wurden auch in der Plazenta des Rindes gemessen (Hoffmann et al., 2001).

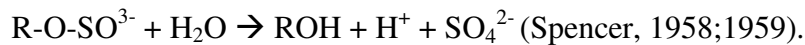
In der cytosolischen Fraktion gereinigter Leydig-Zellen aus Eberhoden konnten Hobkirk et al. (1989) jeweils eine spezifische OST und eine solche für neutrale Steroide (Androstendiol, Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon) nachweisen.

Für die OST-Aktivität erscheint eine hormonabhängige Regulation wahrscheinlich, nachdem Brooks et al. (1987) im Endometrium des Schweins zyklusabhängige Schwankungen entdeckten, die auch für den menschlichen Menstruationszyklus bestätigt wurden (Tseng und Liu, 1981; Clarke et al., 1982).

### 2.2.3.3 Arylsulfatase C (ASC)

Arylsulfatasen sind phylogenetisch sehr alte Enzyme, die ubiquitär in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vorkommen; aufgrund ihrer hohen Thermostabilität findet man sie auch in den Archaeobakterien heißer Schwefelquellen.

Arylsulfatasen katalysieren die Hydrolyse der O-S-Bindung zahlreicher Schwefelverbindungen:



Ihre Einteilung erfolgte anhand ihrer subzellulären Verteilung, ihrer chemikophysikalischen Eigenschaften und ihrer Substratspezifität (Dodgson und Spencer, 1957).

Generell unterscheidet man bei den Arylsulfatasen zwei Typen:

#### Typ I-Arylsulfatasen:

Unter diesem Begriff, für den „Arylsulfatase C“ synonym verwendet wird, fasst man die Enzyme zusammen, die ein neutrales bis alkalisches pH-Optimum aufweisen (pH 6-9; Ruoff and Daniels, 1991) und nicht durch Substratüberschuss hemmbar sind. Außerdem hydrolysieren sie synthetische phenolische Substrate wie p-Acetylphenylsulfat oder p-Nitrophenylsulfat.

Bei den Säugetieren sind sie in der Regel unlöslich, da sie integraler Bestandteil der zellulären Mikrosomenmembran sind (Roy, 1976; Noël et al., 1983; Farooqui, 1987). Gadella et al. (1992) bezeichnen sie auch als mikrosomale Arylsulfatasen bzw. Sterol- oder Steroidsulfatasen. Als endogene Substrate dienen verschiedene Steroidsulfate.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese wurde bei der Arylsulfatase C humaner Fibroblasten zwischen einer s- (slow) und einer f- (fast) Form differenziert (Chang et al., 1986), wobei lediglich die s-Form Steroidsulfate als Substrat nutzen kann (Simard et al., 1985; Chang et al., 1990). Zu diesen Substraten gehören, mit aufsteigender Affinität, Cholesterinsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat, Pregnenolonsulfat und Estronsulfat (Roy, 1976; Noël et al., 1983).

### Typ II-Arylsulfatasen:

Diese sind weniger weit verbreitet und unterscheiden sich vom Typ I durch ein pH-Optimum bei pH 4,8 (Arylsulfatase A) und pH 5,9 (Arylsulfatase B; Roy und Mantle, 1989), Hemmung durch Substratüberschuss und die Hydrolyse des synthetischen p-Nitrocatecholsulfates.

Aufgrund ihrer lysosomalen Lokalisation werden sie auch als „lösliche Arylsulfatasen“ bezeichnet (Gadella et al., 1992).

Die hydrophile Arylsulfatase A wurde in verschiedenen Geweben (z.B. Leber, Niere, ZNS, Gonaden, Speicheldrüsen) praktisch sämtlicher bisher untersuchten Spezies (Ratte, Schwein, Kaninchen, Mensch) nachgewiesen.

Substrate sind vornehmlich Sulfatide, wie an Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie festgestellt werden konnte (Farooqui und Bachhawat, 1972; Mehl und Jatzkewitz, 1968). Bei dieser Krankheit führt der Mangel an Arylsulfatase A zu einer abnormen Anhäufung von Sulfatiden in Gehirn und Nieren. Eine besondere Bedeutung kommt der Arylsulfatase A jedoch bei der Desulfatierung des Seminolipids zu, einem spezifischen Sulfogalaktolipid, welches vornehmlich in Hoden und Samenzellen von Säugetieren gefunden wird (Yamato et al., 1974). Da Seminolipid als Stabilisator der Spermienmembran fungieren soll, wird bei der Arylsulfatase A eine spezifische Rolle im Ablauf der Spermienkapazitation sowie der Akrosomreaktion vermutet (Dudkiewicz, 1984; Tanphaichitr et al., 1990; Gadella et al., 1991).

Die hydrophile basische Arylsulfatase B desulfatiert Glykosaminoglykane, wie z.B. Dermatansulfate (Chang et al., 1986), möglicherweise auch Glykoproteine (Fluharty et al., 1975). Auch ihr wird im Bereich der männlichen Reproduktion eine wichtige Funktion bei der Spermienagglutination und der Zonabindung nachgesagt (Gadella et al., 1991).

Ohne zwischen den einzelnen Formen der Steroidsulfatasen zu differenzieren, finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise auf deren Vorkommen; diese Feststellung deckt sich mit der Beobachtung von Iwamori et al. (1976), die in der Leber des Schweins gleich mehrere Isoformen mit verschiedenen Substratspezifitäten vorfanden.

Burstein und Dorfman (1963) wiesen Steroidsulfatasen bei Säugern (Mensch, Rind, Schwein, Ratte und Meerschweinchen) vornehmlich in den endokrinen Organen wie Nebenniere und Hoden nach, aber auch in der Leber; die höchsten Aktivitäten wurden dabei in Rattenleber und -nebenniere gemessen.

Bezüglich der Aktivität im Hoden rangierte das Meerschweinchen vor Ratte, Mensch, Rind und Schwein. Kawano et al. (1973) lokalisierten im Hoden des Mannes die testikuläre

Steroidsulfataseaktivität im Bereich der Tubuli seminiferi, bei der Ratte im Interstitium. Substrate für die Steroidsulfatase bei der Ratte waren Pregnenolonsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat (Payne und Kelch, 1975), die Mikrosomenfraktion einer porcinen Leydig-Zell-Kultur hydrolysierte, von den angebotenen Substraten Estronsulfat, Pregnenolonsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat, lediglich Estronsulfat (Hobkirk et al., 1989).

Eine plazentare Steroidsulfataseaktivität findet sich bei Mensch (Dibbelt und Kuss, 1984), Meerschweinchen (Hobkirk et al., 1982), Schaf (Mason et al., 1989) und Rind (Mattioli et al., 1984, Hoffmann et al., 2001). Es ist davon auszugehen, dass ihre Funktion u.a. in der Bereitstellung freier Steroide für die Östrogenbiosynthese durch Hydrolyse von Präkursoren besteht (Diczfalusy, 1969), oder aber in der Regulation der Verfügbarkeit biologisch aktiver Östrogene (Hoffmann et al., 2001).

#### **2.2.4 Beteiligung der akzeßorischen Geschlechtsdrüsen am Steroidmetabolismus**

Nach Untersuchungen von Booth (1983b) besitzen weder die Prostata noch die Glandula vesicularis oder der Nebenhoden des Ebers die Fähigkeit zur aktiven Östrogensynthese. Die Transformation von Estronsulfat in freie Östrogene (Estron und Estradiol) sowie in Estradiolsulfat wurde dagegen beobachtet (Booth, 1983b).

Die akzeßorischen Geschlechtsdrüsen können außerdem freies Estron zu Estradiol-17 $\beta$  und umgekehrt metabolisieren. In einer neueren Untersuchung konnten Raeside et al. (1999) auch in den Samenblasen- und Bulbourethraldrüsen juveniler Schweine Sulfo- und Glucuronosyltransferasen-Aktivität feststellen.



## **2.2.5 Östrogengehalte in Sekreten des Genitaltraktes beim Eber**

### **2.2.5.1 Tubuli seminiferi und Nebenhoden**

Nach Claus et al. (1985) liegen beim Eber die Konzentrationen freier Östrogene in der Tubulusflüssigkeit (Tubuli seminiferi contorti) bei  $55,4 \pm 8,4$  ng/ml, die der konjugierten bei  $35,8 \pm 6$  ng/ml. Bei den freien Östrogenen dominierte das Estradiol-17 $\beta$  mit 77% vor Estron mit 23%, für die konjugierten Östrogene liegen keine Angaben vor.

Im Verlauf der Nebenhodenpassage kommt es zu einer Verminderung der Konzentration der freien Östrogene und einer Verschiebung des Verhältnisses von Estradiol zu Estron zu Gunsten von Estron. Die Konzentrationen konjugierter Östrogene vermindern sich hingegen nicht.

### **2.2.5.2 Ejakulat**

Das Vorhandensein von Östrogenen in Samenflüssigkeit bei Mensch (Riisfeldt, 1948) und verschiedenen Haustieren, darunter Bulle (Ganjam und Amann, 1976; Eiler und Graves, 1977), Eber (Claus et al., 1983; 1985) und Hengst (Raeside und Christie, 1997; Hoffmann und Landeck, 1999) gab Anlass zu Spekulationen bezüglich ihrer biologischen Effekte. So liegen nach Claus et al. (1983; 1985) die Konzentrationen freier Östrogene im Seminalplasma vom Eber dreimal höher als im Blutplasma; die Konzentrationen der konjugierten Östrogene hingegen betrugen nur ein Drittel der im Blut gemessenen Werte. Weiterhin wurde bei Mensch (Cheng et al., 1981; Allag et al., 1983), Schwein (Claus et al., 1985) und Pferd (Raeside und Christie, 1997; Hoffmann und Landeck, 1999) eine unspezifische Bindung der Östrogene an die Spermienoberfläche beschrieben. So wurde beim Eber im Vollejakulat eine doppelt so hohe Östrogenkonzentration wie im Seminalplasma gemessen, woraus gefolgert wurde, dass die Spermien während der Passage durch die samenableitenden Wege als Hormon-Carrier fungieren, da der geschätzte Anteil der Östrogene, der über die akzeßorischen Geschlechtsdrüsen in das Ejakulat sezerniert wird, bei lediglich 12% (Konjugate) bzw. 22% (freie Formen) liegt (Claus et al., 1985).

Die von Claus et al. (1983) im Gesamt-Eberejakulat gemessenen Werte lagen im Mittel bei 4,5 µg Estronsulfat sowie 5µg freies Estradiol bzw. 2µg freies Estron. Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu bisher bei einigen Haustieren im Ejakulat und Ejakulatfraktionen gemessenen Östrogenwerten.

Tab. 2: Zusammenstellung bisher gemessener Östrogenkonzentrationen in der Samenflüssigkeit verschiedener Haustiere (nach Umrechnung alle Angaben in nmol/l)

<b>Tierart</b>	<b>E1</b>	<b>E2β</b>	<b>E1S</b>	<b>Art der Probe</b>	<b>Quelle</b>
<b>Pferd</b>	0,44 (1,53) $\bar{X}_g^*(DF)$	0,09 (1,42) $\bar{X}_g^*(DF)$	7,80 (1,42) $\bar{X}_g^*(DF)$	Seminal-plasma	Hoffmann und Landeck 1999
			2,08-23,23		
			1,54-7,07	Sperma <sup>1)</sup>	Raeside und Christie 1997
			74,10-344,85	Gesamt-ejakulat	
<b>Rind</b>	39,10			Rete testis-Flüssigkeit	Ganjam und Amann 1976
	2,89±0,14			Gesamt-ejakulat	Eiler und Graves 1977
<b>Schwein</b>	3,18±4,03	1,60±2,16	6,27±5,70	Seminal-plasma	Claus et al. 1985
	61,49±22,87	144,26±53,64	30,61±12,63	Tubulus-Flüssigkeit <sup>2)</sup>	
	5,66±6,99	2,79±3,61	9,35±8,38	Gesamt-ejakulat	

<sup>1)</sup> durch Zentrifugation aus dem Ejakulat gewonnene Fraktion reiner Samenzellen

<sup>2)</sup> nach Anschnitt der Hoden gewonnene Flüssigkeit

### 2.2.6 Lokalisation der testikulären Östrogenproduktion

Aus in vitro-Untersuchungen mit Hoden juveniler Ratten schlossen Dorrington und Armstrong (1975), dass die Sertoli-Zellen der Produktionsort testikulärer Östrogene sind; sie hatten in diesem Versuch zeigen können, dass in Sertoli-Zell-Isolaten in Anwesenheit von FSH Testosteron zu Estradiol aromatisiert werden kann.

Dem widersprechen Payne et al. (1976), die die Lokalisation des Enzyms Cytochrom P450 Aromatase, zumindest beim Menschen, im interstitiellen Hodengewebe vermuteten.

Diesen scheinbaren Widerspruch konnte Pomerantz (1979) dahingehend aufklären, indem er feststellte, dass die Aromatisierung von Androgenen eine Funktion ist, die in der jungen Ratte von Sertoli- und Leydig-Zellen gemeinsam wahrgenommen, bei den adulten Tieren aber allein von den Leydig-Zellen aufrechterhalten wird.

#### 2.2.6.1 Leydig-Zellen

Embryologisch differenzieren sich die Leydigzellen des Schweins aus fibroblastenähnlichen Zellen mesenchymalen Ursprungs heraus (Moon und Hardy, 1973) und stellen gemeinsam mit Bindegewebe sowie den Blut- und Lymphgefäßen das Hodeninterstitium dar.

Fawcett et al. (1973) beschreiben die Leydigzellen im Schweinehoden als „intertubulär dicht gepackt“, assoziiert mit kleinkalibrigen, schmalen Blut- und Lymphgefäßen.

Nach ihrer ursprünglichen Lokalisation unterscheiden van Straaten und Wensing (1978) peritubuläre von intertubulären Leydig-Zellen, da durch die Knäuelung der Samenkanälchen während der Hodendifferenzierung die Leydig-Zell-Nester in entsprechende Bereiche versprengt werden. Die peritubulär gelegenen Zellen differenzieren sich etwas später als die intertubulären, und stellen die Vorläufer der endgültigen Leydig-Zell-Population dar.

Elektronenmikroskopisch konnten van Vorstenbosch et al. (1984) zeigen, dass die peritubulären Leydig-Zellen während der 2. Welle der Entwicklung langsam in die intertubulären Bereiche einwandern, während die intertubulären Leydig-Zellen allmählich degenerieren.

Nach Eintritt in die Pubertät, beim Schwein etwa ab der 13. Lebenswoche, ist die endgültige Leydig-Zell-Population erreicht (van Straaten und Wensing, 1978).

Unter Einfluss von Gonadotropinen wie LH und FSH kommt es zur Hypertrophie und Hyperplasie der Leydig-Zellen und zur verstärkten Steroidsynthese (Mather et al., 1982; van

Vorstenbosch et al., 1984; Kerr und Sharpe, 1985). Wird die gonadotrope Wirkung durch Hypophysektomie, hormonelle Suppression oder Neutralisation mittels spezifischer Antikörper entzogen, kommt es zur Zellatrophie, in Verbindung mit einem Verlust an glattem endoplasmatischem Reticulum sowie der Anzahl an LH-Rezeptoren, die Steroidbiosynthese kommt weitgehend zum Erliegen (van Vorstenbosch et al., 1984; Teerds et al., 1989).

Der Anteil des Interstitiums am Eberhoden liegt bei ca. 40% und damit höher als bei anderen Tierarten (Fawcett et al., 1973; Liebich 1990).

Für das Schwein konnte gezeigt werden, dass die Anbildung der Leydig-Zellen in drei Wellen erfolgt. Eine erste transiente Phase wird direkt nach der Geschlechtsdifferenzierung, zwischen Tag 30 und 60 post coitum beobachtet (Moon und Hardy, 1973). Die zweite Welle erreicht ihre Spitze am Tag 20 post partum, um in der 5. Lebenswoche wieder abzuebben (van Straaten und Wensing, 1978; van Vorstenbosch et al., 1984). Welle drei startet mit Eintritt der Pubertät in der ca. 13. Lebenswoche und sorgt für die Stammpopulation an Leydig-Zellen; sie ist, wie Welle 2, LH-abhängig (van Vorstenbosch et al., 1984). Hormonell begleitet wird die Ontogenese der Leydig-Zellen von messbaren Testosteron- und Estronsulfat-Konzentrationen ab dem 27. bzw. 31. Tag post coitum, wobei die Testosteronsekretion ab Tag 33 zugunsten der Östrogensekretion stagniert (Raeside et al., 1993).

Nach van Straaten und Wensing (1978) sind die in diesen Phasen sekretorisch aktiven Leydig-Zellen beim Schwein deutlich an ihrem vermehrten Gehalt an endoplasmatischem Retikulum und gesteigerter Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität zu erkennen.

Die Leydig-Zellen sind der Ursprungsort der Androgensynthese (Hall, 1988), wobei sie nach Payne und Youngblood (1995) bei sämtlichen männlichen Individuen die einzige Zellpopulation im Hoden darstellen, in der Steroide und somit auch die Östrogene synthetisiert werden.

Für das Schwein konnte dies in Untersuchungen an aufgereinigten porcinen Leydig- und Sertoli-Zell-Kulturen unter hCG-Stimulation gezeigt werden, da nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Androstendion lediglich aus der Leydig-Zell-Fraktion freie und konjugierte Östrogene extrahiert werden konnten (Raeside und Renaud, 1983; Raeside und Lobb, 1984).

Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression der Aromatase haben bereits beim neugeborenen Schwein sowie beim Menschen die Leydig-Zellen als die Orte der testikulären Östrogensynthese bestätigt (Conley et al., 1996; Brodie und Inkster, 1993; Inkster et al., 1995).

In weiterführenden Untersuchungen zur Steroidsynthese im Eberhoden konnte darüber hinausgehend gezeigt werden, dass neben Androstendion in den Leydig-Zellen auch 19-Norandrogene wie 19-Nortestosteron und 19-Norandrostendion produziert werden und als Substrat der Estronsulfat-Synthese dienen (Raeside et al., 1989).

#### **2.2.6.2 Sertoli-Zellen**

Die Sertoli-Zelle stellt im Hoden die Zielzelle für das „Follikelstimulierende Hormon“ (FSH) dar. Als morphologische Besonderheit gelten die zwischen benachbarten Zellen ausgebildeten Verzahnungen, die sogenannten „tight junctions“, welche die eigentliche „Blut-Hoden-Schranke“ formieren. Diese Barriere gegenüber größeren Molekülen bietet die Möglichkeit, in einem abgeschotteten Bereich ein spezifisches Milieu für die Spermatogenese zu schaffen. Außerdem stellt sie ein effektives Abwehrschild gegen das körpereigene Immunsystem dar (Hermo und Lalli, 1978).

Darüber hinausgehend bilden die Sertoli-Zellen mit „ektoplasmatischen Spezialisierungen“ Kontaktstellen zu den Keimzellen, über die, jeweils abgestimmt auf das Stadium der Spermatogenese, Nähr- und Botenstoffe ausgetauscht werden (Russell et al., 1983; Griswold et al., 1988; Jones, 1998). Nach dem von Leblond und Clermont (1952) an der Ratte aufgestellten Schema stehen mit einer Sertoli-Zelle ein oder zwei Generationen Spermatogonien der Basalmembran, ein oder zwei Generationen Spermatocyten und ein oder zwei Generationen Spermatiden in unmittelbarer Verbindung.

Mit den verschiedenen Entwicklungsstadien des Keimepithelzyklus verändert sich auch die Sertoli-Zelle morphologisch, indem mehr oder weniger Mikrotubuli im Cytoplasma auftauchen. Diesen Bestandteilen des Cytoskeletts werden unter anderem Funktionen im passiven Bewegen von Spermatiden zugeschrieben (Fawcett, 1975).

Sertoli-Zellen sind die Produzenten des „Androgen Binding Protein“ und Inhibins. Bei Inhibin handelt es sich um einen hormonalen Wirkstoff, der selektiv die hypophysäre FSH-Produktion hemmt. Daneben sind juvenile Sertoli-Zellen offensichtlich auch zur Östrogensynthese befähigt (s.S.20). Weiter muss angenommen werden bzw. ist teilweise belegt, dass durch Sertoli-Zellen eine Vielzahl parakriner, die Spermatogenese

beeinflussender Faktoren gebildet werden (Papadopoulos et al., 1987; Benahmed et al., 1985).

## **2.3 Der Nebenhoden**

Der die aus dem Hoden abgehenden Spermien übernehmende Nebenhoden ist ein multifunktionales Gebilde, das u.a. dem Transport, der Speicherung und weiteren Reifung der Samenzellen dient. Im Nebenhoden wird nicht nur Rete testis-Flüssigkeit resorbiert (s.u.), sondern es werden auch Proteine sezerniert (Syntin et al., 1999). Er zeigt weiter eine vom Hoden unabhängige Enzymausstattung (Aafjes und Vreeburg, 1972; Robaire et al., 1977; Bouthillier et al., 1984; Raeside et al., 1999).

### **2.3.1 Aufbau und Funktion des Nebenhodens**

Der Nebenhoden wird in die Segmente Nebenhodenkopf, Nebenhodenkörper und Nebenhodenschwanz unterteilt. Histomorphologisch kann der Nebenhoden darüber hinausgehend bei den Mammalia in 4 bis 8 Segmente unterteilt werden (Nicander et al., 1983), funktionell ist jedoch eine Unterteilung in 3 Abschnitte sinnvoll, die nicht unbedingt mit der anatomischen Einteilung in Caput, Corpus und Cauda konform sein muss (Glover und Nicander, 1971).

Sie reflektiert die Arbeitsteilung entlang des Ductus epididymidis, ausgehend von der vornehmlich mit der Spermienreifung befassten proximalen Region, über den eigentlichen Nebenhodengang, in dem es zur Spermienkonzentration durch eine Rückresorption des Großteils der luminalen Flüssigkeit kommt (Turner, 1984; Hess et al., 1997), bis hin zur distalen, auf die Speicherung „maturer“ Spermien spezialisierte Region.

Der proximale Bereich spielt möglicherweise auch eine Rolle in der Protektion der Spermien gegenüber oxidativen und anderen Schädigungen (Hinton und Palladino, 1995) sowie in der Vorbereitung der Samenzellen auf die Speicherung (Bedford und Yanagimachi, 1991).

Der Nebenhoden ist aus embryologischer Sicht ein Abkömmling der Urnierenkanälchen. Die aus dem Hoden austretenden zahlreichen Ductuli efferentes (14-21 beim Eber) vereinigen sich und bilden den Nebenhodengang, den Ductus epididymidis. Außen umkleidet den Nebenhodengang eine glatte Muskelschicht, die zum Schwanz hin deutlich kompakter wird. Ausgekleidet wird der Ductus epididymidis von einem zweireihigen hochprismatischen Epithel, dessen Höhe sich nach kaudal allmählich verringert und das mit Kinocilien ausgestattet ist. Daneben existieren noch niedrigere, mit Mikrovilli ausgestattete Epithelzellen, sowie der Basalmembran anliegende Basalzellen, welche jedoch nicht an die Epitheloberfläche heranreichen. Die einzelnen Wandabschnitte sind durch lockeres Bindegewebe verbunden, in welchem zahlreiche Makrophagen und Leukocyten, sowie die Gefäße und Nerven eingelagert sind. Der starke Zilienbesatz dient vornehmlich dem Transport von Spermien und Rete Testis-Flüssigkeit. Die mit zahlreichen Mikrovilli und Lysosomen ausgestatteten Epithelzellen zeichnen sich durch eine hohe, die Samenflüssigkeit betreffende Resorptionskapazität aus (Liebich, 1990).

Die Angaben über die Länge des stark geschlängelten Nebenhodenganges beim Eber schwanken zwischen 17-18m (Liebich, 1990) und 30m (Dorst, 1991). Trotz der tierartspezifischen Längenunterschiede des Ductus epididymidis dauert die Spermienpassage einheitlich etwa 10-15 Tage.

### **2.3.2 Verstoffwechselung von Steroidhormonen im Nebenhoden**

In den proximalen Abschnitten des Nebenhodens wurde eine vergleichsweise hohe Aktivität der  $5\alpha$ -Reductase gefunden (Aafjes und Vreeburg, 1972; Robaire et al., 1977; Raeside et al., 1999), durch welche Testosteron in den aktiveren Metaboliten  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron umgewandelt wird. Über die Bedeutung von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron für den Nebenhoden konnten allerdings keine Angaben gefunden werden.

Hamilton (1973) beschrieb, dass im in vitro- Versuch mit isoliertem Nebenhodenepithel der Ratte aus Cholesterol Testosteron und in noch größerem Ausmaß Dehydroepiandrosteronsulfat gebildet wird.

Eine Steroidsulfotransferase-Aktivität wurde von Bouthillier et al. (1984) im Nebenhodenkopf des Hamsters gefunden. Entsprechend wurde von Raeside et al. (1999) beim

Eber vor allem im Bereich des Nebenhodenkopfes eine verstärkte Sulfokonjugation von Estradiol-17 $\beta$  ermittelt.

Im Gegensatz dazu ergaben molekularbiologische Untersuchungen von Tong und Song (2002) an Nebenhoden von Mäusen eine OST-Expression vornehmlich im Epithel von Nebenhodenkörper und -schwanz, aber auch im Epithel des Vas deferens, nicht jedoch im Nebenhodenkopf.

Während der Nachweis der OST bisher in verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens und bei verschiedenen Spezies gelang, wurde eine epididymale ASC-Aktivität bislang nur beim Pferd und hier auch nur im distalen Abschnitt des Nebenhodenkörpers und im Nebenhodenschwanz nachgewiesen (Lemazurier und Seralini, 2002).

## **2.4 Zielsetzung der eigenen Untersuchungen**

Ziel der eigenen Untersuchungen war, aufbauend auf dem bisherigen und eher punktuellen Kenntnisstand, durch Erfassung der testikulären Sexualhormonsekretion (Messungen in der Arteria und Vena testicularis) sowie durch deren Messung im peripheren Blut (Vena auricularis/ Vena cava) und Seminalplasma, die spezifische Situation beim Eber weiter zu charakterisieren. Insbesondere sollte dabei auch die Aktivität der Enzyme OST und ASC als lokale, die Bioverfügbarkeit von Östrogenen und anderen Steroiden beeinflussende Regelfaktoren erfasst werden, wobei sich die Untersuchungen vom präpubertären bis postpubertären, geschlechtsreifen Eber erstrecken sollten.



### **3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 Tiermaterial und Probenentnahme**

Es wurden 36 Eber verschiedener Rassen im Alter zwischen 57 und 995 Tagen unter Barbituratnarkose (Surital®) nach gängigem chirurgischen Verfahren kastriert.

Bei einigen Tieren konnte unter der Operation Blut aus der Arteria und Vena testicularis, sowie der Vena auricularis magna oder – sofern entnahmetechnische Probleme auftraten - der Vena cava cranialis bzw. V. jugularis externa gewonnen werden.

Alle Tiere waren geschlechtsgesund und von gutem Allgemeinbefinden.

Von zwei geschlechtsreifen Tieren konnte vor dem Eingriff mit der Handmethode nach Simmet (1974) jeweils ein Ejakulat gewonnen und nach Zentrifugation (20 Minuten bei 1800 g) Seminalplasma hergestellt werden.

Bei drei weiteren gesunden Ebern im Alter zwischen 328 und 1075 Tagen wurde durch Punktion der V. cava cranialis bzw. V. jugularis externa jeweils eine Blutprobe gewonnen.

Weiterhin wurden Ejakulate von 20 adulten Tieren, davon 10 Piètrain-Ebern der Besamungsstation Griesheim, zur Gewinnung von Seminalplasma herangezogen.

Insgesamt ergab sich das in Tabelle 3 dargestellte und definierten Altersgruppen zugeordnete Probenmaterial.

Tab. 3: Übersicht über das entnommene Probenmaterial [Abkürzungen: P= Blut des peripheren Kreislaufs (Vena auricularis magna bzw. Vena cava cranialis ; A= Blut der Hodenarterie; V= Blut der Hodenvene; H= Hodengewebe; NH= Nebenhodengewebe]

Gruppe	Alter des Tieres in Tagen	Eber	Probenmaterial					
			Blut			Seminal-plasma	Gewebe	
			P	A	V		H	NH
100	98	Eber 1-100d	X		X		X	X
	99	Eber 6-100d	X	X	X			
	100	Eber 2-100d	X				X	X
	100	Eber 9-100d	X	X				
	100	Eber 10-100d	X	X	X			
	100	Eber 11-100d	X					
	100	Eber 12-100d	X	X	X			
	100	Eber 13-100d	X	X	X			
	102	Eber 3-100d	X				X	X
	103	Eber 7-100d	X	X	X			
	107	Eber 5-100d	X					
	111	Eber 8-100d	X	X				
	116	Eber 4-100d	X					
150-200	148	Eber 1-150d	X		X		X	X
	151	Eber 2-150d	X		X		X	X
	152	Eber 4-150d	X	X	X			
	156	Eber 3-150d	X		X		X	X
	158	Eber 5-150d	X		X			
	180	Eber A	X		X		X	X
	200	Eber 1-200d		X	X		X	X
	200	Eber 2	X	X	X		X	
	203	Eber 2-200d	X		X		X	X
	207	Eber 3-200d	X	X	X		X	X
	216	Eber 4-200d	X	X	X			
	218	Eber 5-200d	X		X			
	218	Eber 6-200d	X	X	X			
250-365	249	Eber 4-250d		X				
	250	Eber 3-250d	X	X	X			
	272	Eber 5-250d	X	X	X			
	328	Eber 1-328d	X					
	329	Eber 1>200d	X	X	X	X	X	X
	333	Eber 2-333d	X					
	336	Eber 2>200d	X	X	X	X	X	X
>365	365	Eber „Fred“ I				X		
	365	Eber „Müller“				X		
	365	Eber „Bertram“ I				X		
	393	Eber „Frucht“				X		
	446	Eber „Coop“				X		
	476	Eber „Topas“				X		

Gruppe	Alter des Tieres in Tagen	Eber	Probenmaterial					
			Blut			Seminal-plasma	Gewebe	
			P	A	V		H	NH
>365	572	Eber „Fritz“				X		
	582	Eber 3	X	X	X		X	X
	677	Eber „Renan“				X		
	720	Eber „Paul“				X		
	726	Eber HAM-DE				X		
	730	Eber 4	X		X			
	730	Eber „Bertram“ II				X		
	810	Eber 5	X		X			
	844	Eber „Fabul“				X		
	995	Eber „Fritsch“	X	X	X			
	1033	Eber 1 „Willie“	X			X	X	
	1059	Eber „Flippos“				X		
	1075	Eber 3-1075d	X					
	1085	Eber „Fred“ II				X		
	1315	Eber „Stepp“				X		
	1414	Eber „Zito“				X		
	1629	Eber „Visir“				X		
	2793	Eber „Fesch“				X		

Die in 10 ml Ammonium-Heparin-Röhrchen aufgenommenen Blutproben wurden sofort auf ca. 4°C gekühlt und im Labor zentrifugiert; das Blutplasma wurde in 5 ml Kunststoffröhrchen abpipettiert und bei –20°C bis zur Hormonbestimmung aufbewahrt.

Die Ejakulate wurden direkt nach Entnahme bei 20°C in einer Styroporbox ins Labor geschafft, auf Motilität, Dichte und Pathomorphologie der Samenzellen untersucht, wobei sich keine vom Referenzbereich abweichenden Werte ergaben, und zentrifugiert (s.o.). Das gewonnene Seminalplasma wurde in 10 ml Kunststoffröhrchen aliquotiert und ebenfalls bei –20°C bis zu Hormonbestimmung aufbewahrt. Die Seminalplasmaproben aus Griesheim kamen bereits bei –20°C tiefgefroren ins Labor und wurden so bis zur Hormonbestimmung gelagert.

Die bei der Kastration anfallenden Hoden inklusive Nebenhoden wurden sofort in eisgekühlten Phosphat-Puffer (PBS) verbracht und zügig zur weiteren Aufbereitung ins Labor befördert.

Jeweils ein Hoden und Nebenhoden pro Tier wurde für die Herstellung histologischer Präparate (Gefrier- und Paraffinschnitt) konserviert, außerdem wurden weitere Gewebsanteile dieses Hodens direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C verwahrt.

Der andere Hoden und Nebenhoden wurde der direkten Aufbereitung für die vorliegenden Untersuchungen zugeführt.

## 3.2 Präparation des Gewebes

### 3.2.1 Vorzerkleinerung

Die Hoden inklusive Nebenhoden wurden zunächst durch mehrmaliges Waschen in eiskühlem, sterilem PBS-Puffer von anhaftendem Blut gereinigt; bei den Organen von geschlechtsreifen Ebern wurde gleichfalls versucht, bereits jetzt möglichst viele Spermien aus dem Nebenhodenschwanz und dem Samenleiter herauszumassieren. Anschließend wurde der Nebenhoden abpräpariert und Hoden- sowie Nebenhodengewebe jeweils separat weiter verarbeitet.

Hierzu wurde zunächst der Hoden, unter einer Cleanbench (LaminAir<sup>R</sup>, Heraeus) in einer sterilen Petrischale auf Eis stehend, längs halbiert und der stark bindegewebige Anteil des Mediastinum testis, sowie die Tunica albuginea mit Pinzette und Skalpell entfernt. Danach wurden die Hodenhälften in kleine Gewebewürfel zerteilt und in sterilen 20 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis mit einer Schere bis zur musartigen Konsistenz zerkleinert. Auch beim Nebenhoden wurde zunächst der bindegewebige Überzug so gut wie möglich entfernt, wonach dieser bei den geschlechtsreifen Tieren mit Hilfe einer Knopfkanüle und steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gespült wurde, um möglichst alle Spermien zu entfernen. Danach wurde auch der Nebenhoden grob zerteilt und mit einer Schere sorgfältig bis zur breiartigen Konsistenz zerkleinert.

Bei ausgewachsenen Tieren gingen nur der Nebenhodenkopf und die obere Hälfte des Nebenhodenkörpers in die Gewebepräparation mit ein, da der Nebenhodenschwanz aufgrund seines hohen Bindegewebeanteils keine gute Gewebeaufbereitung zuließ und laut Erfahrungen von Bouthillier et al. (1984) beim Hamster Sulfotransferase/Sulfatase-Aktivitäten eher im cranialen Nebenhodenbereich zu vermuten waren. Um den Gewebebrei von Erythrocyten zu säubern, wurde dieser in sterilen Zentrifugengläsern mit steriler, eiskühler Ringerlösung DAB 8 im Verhältnis 1:1 versetzt, mit einem sterilen Glasspatel aufgerührt und in einer auf 0°C vorgekühlten Zentrifuge (Minifuge RF<sup>R</sup>, Heraeus) etwa 3 Minuten bei 450 g zentrifugiert. Die sich hierbei an der Oberfläche der Gewebeschicht absetzenden Erythrocyten wurden samt wässrigen Überstandes mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt; dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, bis der Überstand klar blieb und kein Erythrocytenrasen mehr sichtbar war.

### **3.2.2 Herstellung der Homogenate**

Jeweils 5 g des gewaschenen und eisgekühlten Gewebestreifens von Hoden und Nebenhoden wurden mit 15 ml sterilem, eisgekühltem Ringer-Hepes-Puffer (Verhältnis 39:1) versetzt und mit dem Ultra-Turrax<sup>R</sup> (Ika-Werk) in drei aufeinanderfolgenden Schritten im Eisbad jeweils 1 Minute lang homogenisiert, bevor sie schließlich dreimal mit einem Potter bis zum Grund aufgeschlossen und durch eine doppelte Lage Gaze geseiht wurden.

Diese Arbeitsschritte wurden ebenfalls im Eisbad unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das in Kapitel 3.3.4 beschriebene und zur Untersuchung auf ASC herangezogene Nebenhodenhomogenat wurde wie hier beschrieben hergestellt.

## **3.3 Erfassung der Sulfatase- und Sulfotransferase-Aktivität**

### **3.3.1 Prinzip der Enzymbestimmung**

Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte über die Erfassung der Umwandlung <sup>3</sup>H-markierter Substrate. Für die Bestimmung der Sulfatase-Aktivität wurde <sup>3</sup>H-Estronsulfat (<sup>3</sup>H-E1S), für die der Sulfotransferase-Aktivität <sup>3</sup>H-Estron (<sup>3</sup>H-E1) als Substrat eingesetzt. Dabei orientierten sich die einzelnen Aufarbeitungsschritte an dem von Hoffmann et al. (2001) für die Plazenta des Rindes beschriebenen Verfahren.

### **3.3.2 <sup>3</sup>H-markierte Substratlösungen**

Die jeweiligen <sup>3</sup>H-Substratlösungen wurden aus methanolischen Stammlösungen unter Zugabe von 0,1%iger Ringer-BSA-Lösung auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Diese war für die Inkubation von Homogenaten wie Zellfraktionen für beide Substrate identisch und betrug 0,6 pmol/100 µl Substratlösung.

### 3.3.3 Kontrollproben

Als Kontrollen wurden Medium- wie Gewebeleerwerte angesetzt und jeweils über die Maximalzeit von 60 Minuten mitinkubiert. Der Mediumleerwert enthielt statt der Gewebepräparation eine entsprechende Menge an Inkubationsmedium (Ringer-Hepes-Puffer + 0,1% BSA für Homogenate), während für den Gewebeleerwert ein entsprechendes Aliquot des Untersuchungsmaterials über 30 Minuten im Wasserbad gekocht wurde, um eine Inaktivierung der Enzyme zu erreichen.

### 3.3.4 Inkubationsansätze mit Homogenat

Pro Reaktionsansatz wurden 1 ml Ringer-Hepes-Puffer + 0,1% BSA als Medium, 200 µl Gewebehomogenat (Hoden oder Nebenhoden) und 100 µl  $^3\text{H}$ -Substratlösung ( $^3\text{H}$ -Estron oder  $^3\text{H}$ -Estronsulfat) in ein steriles 15 ml Wheaton-Reaktionsgefäß vorgelegt. Für die Bestimmung der Östrogensulfotransferasen-Aktivität wurden dem Medium zur kompetitiven Hemmung der Steroidsulfatase 5 µmol 4-Nitrophenylsulfat-Kaliumsalz (4-NPS) pro Ansatz zugegeben (Falter 1999); desweiteren wurden diesen Ansätzen in einigen Versuchen auch noch 50 mmol 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat als Co-Faktor (Gregory und Robbins, 1960) für die Sulfotransferase zugesetzt.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des  $^3\text{H}$ -Substrates und 30 sekündiges Mischen auf einem Vortex-Mixer gestartet. Die Proben wurden dann im Wärmeschüttelbad bei 37°C für 0, 5, 15, 30 und 60 Minuten inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch dreiminütiges Kochen der Proben im Wasserbad.

Danach wurden die Proben bis zu ihrer Messung bei -20°C im Tiefgefrierschrank verwahrt.

### 3.3.5 Extraktion und Erfassung von freiem $^3\text{H}$ -Estron

Zur Extraktion des freien  $^3\text{H}$ -Estron wurden die Proben mit jeweils 3,5 ml Toluol überschichtet und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Rotationsmischer über Kopf gemischt. Danach wurden sie kurz anzentrifugiert (1 Minute bei 2000g), die wässrige Phase im Trockeneisbad gefroren und das überstehende Toluol in ein 15 ml Wheaton-Reaktionsgefäß dekantiert. Dieser Schritt wurde noch dreimal wiederholt, wobei das Extrakt durch

Verdampfen des Toluols bei 50°C im Evaporator (HBI-Vortex-Evaporator<sup>R</sup>) zwischen den einzelnen Extraktionsgängen immer weiter eingengt und schließlich bis zur völligen Trockene gebracht wurde. Durch zweimaliges Aufnehmen in jeweils 800 µl Szintillator und 15 minütigen Schütteln auf dem Rotationsmischer über Kopf wurde die Probe rückgelöst und mit einem Dilutor-Dispenser in ein Szintillations-Vial überführt, wonach die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler gemessen wurde.

### **3.3.6 Extraktion und Erfassung von <sup>3</sup>H-Estronsulfat**

Möglicherweise gebildetes <sup>3</sup>H-Estronsulfat wurde nach Hydrolyse als <sup>3</sup>H-Estron gemessen. Dazu wurden nach Extraktion des freien, nicht umgesetzten <sup>3</sup>H-Estrons dem zurückbleibenden wässrigen Probenansatz jeweils 60 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (1:4 verdünnt mit 0,9%iger NaCl-Lösung) und 320 µl Hydrolyse-Puffer zugegeben, wonach die Proben über Nacht bei 37°C im Wärmeschüttelbad inkubiert wurden. Das freie <sup>3</sup>H-Estron wurde anschliessend wie oben beschrieben (Kapitel 3.5.6) extrahiert und die Radioaktivität gemessen.

### **3.3.7 Auswertung der Ergebnisse**

Für jeden Inkubationsansatz wurde die sich aus der Bestimmung von freiem und konjugiertem <sup>3</sup>H-Estron ergebende Radioaktivität (cpm) addiert und gleich 100% gesetzt. Daraus wurde die prozentuale Umsetzung des jeweiligen Substrates (<sup>3</sup>H-Estron und <sup>3</sup>H-Estronsulfat) in <sup>3</sup>H-Estronsulfat und <sup>3</sup>H-Estron berechnet.

### 3.3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen über das Statistikprogramm-Paket BMDP (1993):

- BMDP 1D – Simple Data Description; einfache Datenbeschreibung der ursprünglichen Daten durch Berechnung des arithmetischen Mittelwertes  $\bar{X}$ , der Standardabweichung SD, der Minimal- und Maximalwerte  $X_{\min}$  und  $X_{\max}$  bzw. der logarithmierten Daten durch Berechnung des geometrischen Mittelwertes  $\bar{X}_g$  und des Streufaktors SF,  $\bar{X}_g/\text{SF}$ ,  $\bar{X}_g \cdot \text{SF}$ , sowie  $X_{\min}$  und  $X_{\max}$
- BMDP 6D – Bivariate (Scatter) Plots; Programm zur Erstellung der Korrelationsdiagramme
- BMDP 2V- Analysis of variance and covariance with repeated measures; Varianzanalyse mit Messwiederholungen zur Erfassung zwei- oder dreifaktorieller Effekte

Für die Auswertung der Hormonwerte im Blut wurden die Eber statistisch als eine Datengruppe betrachtet. Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Messwerte wurden die Daten logarithmisch transformiert und somit annähernd normalverteilt.

Desweiteren wurden die Hormonwerte in Abhängigkeit zur jeweiligen Altersgruppe untersucht. Hierbei kam der unpaare Student's t-Test in der Version Excel 97 des Betriebssystems Windows 98 der Fa. Microsoft zum Einsatz.

Die statistische Prüfung auf signifikante Abhängigkeiten der Hormonkonzentrationen wurde mittels des Korrelationskoeffizienten (r) und dessen Signifikanz beurteilt wie folgt:

$p > 0.05$  = nicht signifikant

$p \leq 0.05$  = schwach signifikant

$p \leq 0.01$  = signifikant

$p \leq 0.001$  –  $p < 0,0001$  = hoch signifikant



### 3.4 Steroidanalytik in Blut- und Seminalplasma

#### 3.4.1 Radioimmunologische Bestimmungsverfahren

Für die Bestimmung von Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron mittels Radioimmunoassay (RIA) kam das Prinzip des von Hoffmann (1977) beschriebenen Kompetitionsassays zur Anwendung, für die Bestimmung von Estradiol-17 $\alpha$  und  $\beta$  wurde im Anschluss an die HPLC ein Sequenztest nach Hoffmann et al. (1992) eingesetzt.

Die Durchführung der RIAs erfolgte gemäss der im Labor üblichen „standard operating procedures“ (SOP's), da die Proben innerhalb normaler Routinetests mitbestimmt wurden.

Die Testspezifität ergibt sich durch die Kreuzreaktivität der eingesetzten Antisera.

Zum Einsatz kamen die in Tabelle 4 aufgelisteten Antisera; alle Antisera waren nach Immunisierung von Kaninchen an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz gewonnen worden. Sie wiesen die in Tabelle 5 angegebenen Kreuzreaktionen auf.

Tab. 4: Im RIA eingesetzte Antisera, gewonnen nach Immunisierung von Kaninchen

Antiserum- Charakteristik	Antiserum gegen			
	Estron	Estradiol-17 $\beta$	Testosteron	Progesteron
Bezeichnung	E1-6-CMO-BSA Gi II	E2 $\beta$ -Pool Kaninchen I	Gi-Testosteron I	Gi-P4-IV-Progesteron
Antigen	1,3,5 (10) Estratrien-3 $\beta$ ol, 17on-6 CMO-BSA	1,3,5(10) Estratrien-3,17 $\beta$ -diol-6 CMO-BSA	4-Androsten-11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-3-on-HS-BSA	11 $\alpha$ OH-Progesteron-HS-BSA
Assoziationskonstante K <sub>a</sub>	3,15*10 <sup>9</sup> l/Mol	11,19*10 <sup>9</sup> l/Mol	0,321*10 <sup>9</sup> l/Mol	3,42*10 <sup>9</sup> l/Mol
Verdünnung	1:115000	1:17000	1:50000	1:50000

Tab. 5: Kreuzreaktivitäten in % der im RIA eingesetzten Antisera

	Estron	Estradiol-17 $\beta$	Testosteron	Progesteron
d-Equilenin	12,40			
Equilin	3,92			
Estradiol-17 $\beta$	2,27	100,00	0,04	<0,01
Estradiol-17 $\alpha$	0,64			
DHEA <sup>1)</sup>	0,23	<0,01	<0,01	<0,01
Estriol	0,03	0,68	<0,01	
Androstendion	<0,01	<0,01	0,84	<0,01
DHT <sup>2)</sup>	<0,01	<0,01	47,00	
Cortisol	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Pregnenolon	<0,01	<0,01	<0,01	0,69
Progesteron	<0,01	<0,01	0,02	100,00
Testosteron	<0,01	<0,01	100,00	0,37
17 $\alpha$ OH-P5 <sup>3)</sup>				<0,01
17 $\alpha$ OH-P4 <sup>4)</sup>	<0,01			0,49
Estron	100,00	1,30	<0,01	<0,01

<sup>1)</sup>DHEA = Dehydroepiandrosteron

<sup>2)</sup>DHT = Dihydrotestosteron

<sup>3)</sup>17 $\alpha$ OH-P5 = 17 $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon

<sup>4)</sup>17 $\alpha$ OH-P4 = 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron

### 3.4.2 Angaben zur Durchführung der einzelnen RIA's

Alle Hormonbestimmungen erfolgten im Doppelansatz. Die Bestimmung wurde wiederholt, wenn - gemessen an den Impulsen pro Minute (cpm) - die Abweichung bei mehr als 10% lag.

#### 3.4.2.1 Bestimmung von Estron

Es wurde entsprechend der Standard Operating Procedure und wie bei Gentz (1994) beschrieben vorgegangen.

Jeweils 400 µl Blut- oder Seminalplasma wurden zweimal mit je 3 ml Toluol extrahiert, die vereinigten organischen Phasen im Vortex-Evaporator niedertrocknet und der Trockenrückstand zunächst in 160 µl 0,1N NaOH gelöst, um die Adsorption von Estron an der Glaswand des Wheaton-Reaktionsgefäßes durch die Bildung hydrophiler Natriumsalze (Phenolate) aufzuheben (Weiler 1986).

Nach zehnminütiger Belassung der Proben bei 37°C im Wärmeschüttelbad wurden diese anschließend durch Zugabe von 20 µl 0,8N HCl neutralisiert und das Probenvolumen mit 20 µl konzentriertem Phosphatpuffer auf 200 µl aufgefüllt.

Aus diesen 200 µl wurden 100 µl in den RIA eingesetzt; dies entspricht einer Menge von 200 ml Plasma oder - bezogen auf 1 ml Plasma - einer Verdünnung von 1:5. Bei erwartet hohen Estrongehalten kamen auch Verdünnungen von 1:20, 1:50, 1:100 und 1:500 zum Einsatz.

Als Kontrollen dienten der Reagenzienleerwert sowie eine negative und positive Plasmaprobe.

Als Tracer wurden etwa 17000 dpm ( $\cong$  0,02 pg)  $^3\text{H}$ -Estron, aufgenommen in 100 µl BSA-Phosphatpuffer eingesetzt, es folgte die Zugabe von 400 µl Antiserum-Verdünnung; bezogen auf das Inkubationsvolumen von 600 µl ergab sich damit eine Verdünnung von 1:115000 (s. Tab. 4).

Nach vorsichtigem Schütteln der Proben für 30 Sekunden auf dem Vortex-Mixer, wurden diese für 15 Minuten im Wärmeschüttelbad bei 37°C inkubiert, die weitere Inkubation erfolgte bei 4°C über 1 Stunde im Eiswasserbad oder im Kühlschrank über Nacht.

Danach erfolgte die Trennung des gebundenen vom freien Liganden via Adsorption des freien Liganden an Holzkohle durch Zugabe von je 200 µl einer 0,5%igen Holzkohlesuspension mit Dextranzusatz. Danach wurden die Proben "en bloc" geschüttelt, für 10 Minuten in der Zentrifuge bei 0 - 4°C stehen gelassen, wonach die Abzentrifugation über 15 Minuten und 2220 g erfolgte.

Von dem den antikörpergebundenen Hormonanteil enthaltenden Überstand wurden 400 µl mit einem Dilutor-Dispenser abgehebert, mit 3 ml Szintillator (Aquasafe 300 Plus<sup>R</sup>, Zinsser Analytik) in Szintillationsvials (Zinsser Analytik) überführt und zur Bestimmung der <sup>3</sup>H-Impulse in den Flüssigszintillationszähler gestellt. Die Zählzeit betrug pro Probe 2 Minuten. Die Auswertung erfolgte on-line mit Erfassung der "Totalen" (= Gesamtmenge der in den Test eingegangenen Radioaktivität), des "NSB" (= nichtspezifische Bindung), des "B0-Wertes" (= Anteil an Radioaktivität, der in Abwesenheit unmarkierten Antigens gebunden wird) und den Punkten der Standardkurve. Die Standardkurve deckte den Bereich von 20 bis 3200 fmol pro Ansatz ab.

Die untere Nachweisgrenze wurde für E1 und E1S als 0,2 nmol/l ( $\cong$  0,05 ng/ml E1, 0,07 ng/ml E1S) definiert. Proben, die bei der E1- und E1S-Bestimmung unterhalb der Nachweisgrenze lagen, gingen mit dem Wert 0,1 nmol/l ( $\cong$  0,03 ng/ml E1, 0,04 ng/ml E1S) in die Berechnungen ein.

#### **3.4.2.2 Bestimmung von Estronsulfat**

Ausgangsmaterial für die Bestimmung von Estronsulfat waren das Blut- und Seminalplasma nach Extraktion von freiem Estron. Das in wasserlöslicher Form vorliegende Estronsulfat wurde - wie bereits oben beschrieben - über Nacht einer Hydrolyse im Wärmeschüttelbad bei 37°C unter Zugabe von 140 µl Hydrolyse-Puffer und 50 µl  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase (1:25 verdünnt mit 0,9% NaCl-Lösung) aus *Helix pomatia* unterzogen. Kontrollen waren auch hier ein Proben-Leerwert sowie positives und negatives Kontrollplasma. Die anschließende Extraktion der Proben und die Durchführung des RIA entsprachen der Bestimmung von freiem Estron.

### 3.4.2.3 Bestimmung von Testosteron

Das der Standard Operating Procedure zugrunde liegende Verfahren ist im Detail bei Landeck (1997) beschrieben.

Jeweils 100 µl Blut- oder Seminalplasma wurden zweimal mit je 2 ml Toluol extrahiert. Die gepoolten Extrakte wurden zur Trockne gebracht, der Trockenrückstand direkt in 100 µl BSA-Puffer aufgenommen und in die radioimmunologische Bestimmung eingebracht. Alle weiteren Arbeitsschritte ergaben sich wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben. Als Tracer wurden etwa 16000 dpm ( $\approx 0,02$  pg)  $^3\text{H}$ -Testosteron, aufgenommen in 100 µl BSA-Phosphatpuffer, eingesetzt, die Endverdünnung des Antiserums betrug 1:50000.

Die Testosteron-Standardkurve deckte den Bereich von 20 bis 2560 fmol pro Ansatz ab, die untere Nachweisgrenze ergab sich mit 0,2 nmol/l ( $\approx 0,06$  ng/ml). Proben, die unterhalb dieser Nachweisgrenze lagen, gingen mit 0,1 nmol/l ( $\approx 0,03$  ng/ml) in die Berechnungen ein.

### 3.4.2.4 Bestimmung von Progesteron

Die Bestimmung erfolgte im Prinzip wie bei Hoffmann et al. (1973) beschrieben und entsprechend der im Labor etablierten SOP (s. bei Gentz, 1994; Schneider, 1992).

Ausgangsmenge waren auch hier 100 µl Blut- oder Seminalplasma, die Extraktion von Progesteron erfolgte mit jeweils zweimal 2 ml Hexan pro Ansatz. Die weitere Testdurchführung ergab sich auch hier wie in Kap. 3.4.2.1 beschrieben. Als Tracer wurden etwa 20000 dpm ( $\approx 0,026$  pg)  $^3\text{H}$ -Progesteron, aufgenommen in 100 µl BSA-Puffer, eingesetzt, die Antiserum-Verdünnung lag bei 1:50000.

Die Standardkurve deckte den Bereich zwischen 40 und 2560 fmol pro Ansatz ab, die untere Nachweisgrenze lag bei 0,4 nmol/l ( $\approx 0,13$  ng/ml). Proben unterhalb dieser Nachweisgrenze gingen mit 0,32 nmol/l ( $\approx 0,1$  ng/ml) in die statistischen Berechnungen ein.

### **3.4.2.5 Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$ und Estron nach Auftrennung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Auch bei diesen Untersuchungen wurde zwischen freien und konjugierten Östrogenen differenziert, wobei dazu wie unter 3.4.2.1 und 3.4.2.2 beschrieben vorgegangen wurde. Um die Spezifität der Messung zu erhöhen, erfolgte hier die Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$  und Estron nach vorheriger Auftrennung der Probe mittels HPLC.

Die sich daran anschließende Bestimmung von Estron erfolgte wie unter 3.4.2.1 angegeben, während bei Estradiol-17 $\beta$  zur weiteren Steigerung der Empfindlichkeit ein Sequenztest zur Anwendung kam.

Details zur Methodik finden sich bei Höveler (1991), Hoffmann et al. (1997) und Pinho (1995). Im Prinzip wurde wie folgt vorgegangen:

Jeweils 200  $\mu$ l Blut- oder Seminalplasma wurden vor bzw. nach der Hydrolyse mit je 2 ml Toluol extrahiert und zur Trockne gebracht. Der Extrakt wurde danach in 1400  $\mu$ l Methanol rückgelöst und säulenchromatographisch über „reversed phase-Bakerbond-Kartuschen“ vorgereinigt (Pinho, 1995) und das Eluat nach dem Niedertrocknen in 120  $\mu$ l 20%igem Acetonitril aufgenommen.

Davon wurden 100  $\mu$ l über eine Probenschleife auf die HPLC- Säule aufgetragen, die zuvor zur Äquilibration bei 40°C über 9 Minuten mit 28%igem Acetonitril und einer Flussrate von 0,5 ml pro Minute gespült worden war. Die Elution erfolgte ebenfalls bei 40°C über 35,5 Minuten mit 28% Acetonitril. Das Elutionsprofil war anhand von  $^3\text{H}$ -Estron und  $^3\text{H}$ -Estradiol standardisiert worden, so dass über einen Probensammler die Estron- und Estradiol-17 $\beta$ -haltige Fraktion gezielt aufgefangen werden konnte.

Es folgte eine neunminütige Spülung der Säule mit 100% Acetonitril zur Reinigung und erneuten Verwendung.

### 3.5 Liste der eingesetzten Chemikalien, Materialien, Geräte und Pufferlösungen

#### 3.5.1 Chemikalien

NaCl reinst, *Merck - Darmstadt*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , *Merck - Darmstadt*

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , *Merck - Darmstadt*

Ringerlösung DAB8, *Braun - Melsungen*

HEPES-Puffer (1M), *Sigma - Deisenhofen*

Bovines Serumalbumin (BSA), *Sigma - Deisenhofen*

4-Nitrophenylsulfat-Kaliumsalz, *Fluka – Buchs (CH)*

3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS), *Fluka – Buchs (CH)*

1N NaOH, *Merck - Darmstadt*

Toluol pro analysi, *Merck - Darmstadt*

Aquasafe 300- Scintillator, *Zinsser – Frankfurt/Main*

$\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase from *Helix pomatia*, *Serva - Heidelberg*

1N  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , *Merck - Darmstadt*

Methanol für Chromatographie, *Merck - Darmstadt*

Methanol pro analysi, *Merck - Darmstadt*

$\text{H}_2\text{O}$  dest. für Chromatographie, *Merck - Darmstadt*

#### 3.5.2 $^3\text{H}$ -markierte Steroide

##### 3.5.2.1 $^3\text{H}$ -Substrate für die Bestimmung der Enzymaktivitäten

(6,7- $^3\text{H}$ )-Estron, spezif. *NEN-Dupont - Dreieich*

spezifische Aktivität:  $48,1 \text{ Ci/mmol} \hat{=} 1779,7 \text{ GBq/mmol}$

(6,7- $^3\text{H}$ )-Estronsulfat-Ammoniumsalz, *NEN-Dupont - Dreieich*

spezifische Aktivität:  $49 \text{ Ci/mmol} \hat{=} 1813 \text{ GBq/mmol}$

### 3.5.2.2 $^3\text{H}$ -markierte Steroide für die Hormonbestimmungen mittels RIA

(2,4,6,7- $^3\text{H}$ )-Estron, *Amersham - Braunschweig*

spezifische Aktivität: 95 Ci/mmol  $\hat{=}$  3,52TBq/mmol

(1,2,6,7- $^3\text{H}$ )-Testosteron, *Amersham - Braunschweig*

spezifische Aktivität: 91 Ci/mmol  $\hat{=}$  3,37 TBq/mmol

(1,2,6,7- $^3\text{H}$ )-Progesteron, *NEN-Dupont - Dreieich*

spezifische Aktivität: 97 Ci/mmol  $\hat{=}$  3589 GBq/mmol

(2,4,6,7- $^3\text{H}$ )-Estradiol, *NEN-Dupont - Dreieich*

spezifische Aktivität: 72 Ci/mmol  $\hat{=}$  2664 GBq/mmol

### 3.5.3 Materialien und Geräte

Ultra-Turrax<sup>R</sup>, *Janke +Kunkel - Staufen*

Potter (60 ml mit Teflonpistill), *Braun - Melsungen*

Minifuge RF, *Heraeus - Hanau*

Biofuge 28 RS, *Heraeus - Hanau*

REAX 2000 Vortexer, *Heidolph - Kelkheim*

LaminAir Flow<sup>R</sup> HA2448 GS, *Heraeus - Hanau*

HBI Vortex-Evaporator<sup>R</sup>, *Haake-Buchler – Saddle Brook N.J. (US)*

Vakuumpumpe N726.3 FT18, *Neuberger – Freiburg-Munzingen*

Varifuge K, *Heraeus - Hanau*

Varifuge 3.0R, *Heraeus - Hanau*

Rotationsmischer REAX-2, *Heidolph - Kelkheim*

Wärmeschüttelbad 3047, *Köttermann - Hänigsen*

Zinsser minis 2000, *Zinsser – Frankfurt/Main*

Wheaton Minis Vitro 180, *Zinsser – Frankfurt/Main*

Wheaton 15ml, *Zinsser – Frankfurt/Main*

Flüssigszintillationszähler LS 5000 TD, *Beckman Instruments – Fullerton CA (US)*

Baker spe-10 Column Processing System<sup>R</sup>, *Baker Inc. – Groß-Gerau*

Bakerbond spe-Trennsäulen C<sub>18</sub> 1ml, *Baker Inc. – Groß-Gerau*

Vorfilter REPL Filter 0.5µm x 3mm, *Latek - Eppelheim*

HPLC-Säule: LiChrospher RP-18 (5µm); EcoCart<sup>®</sup> 125-3, *Merck Cat. 51232 – Darmstadt*



Vorsäule: LiChroCart 4-4, RP-18 (5µm); LiChrospher® 100, Merck Cat.1.50957 - Darmstadt  
Multiport<sup>R</sup>, Kontron Instruments - Eching  
Degaser ERS-3612<sup>R</sup>, ERC - Alteglofsheim  
Zweikolbenpumpe: HPLC Pump 420<sup>R</sup>, Kontron Instruments - Eching  
Fraktionssammler: Fraction Collector Frac-100, Pharmacia Fine Chemicals - Freiburg  
Haake Fe-2 Wärmeumwälzbad, Haake Meßtechnik - Karlsruhe  
Medifuge, Heraeus - Hanau  
Labofuge I, Heraeus Christ - Hanau

### 3.5.4 Eingesetzte Pufferlösungen

#### PBS-Puffer pH 7,5:

16,0 g Natriumchlorid (NaCl)

2,88 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,4 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

ad 2000 ml Aqua dest.

anschließend 2 Stunden bei 140°C sterilisieren

#### Ringer-HEPES-Puffer:

390 ml Ringer-Lösung

10 ml HEPES

#### Ringer-HEPES-BSA:

390 ml Ringer-Lösung

10 ml HEPES

0,4 g Bovines Serumalbumin (BSA)

#### EIS-Hydrolysepuffer:

300 ml 1N Natriumhydroxid (NaOH)

100 ml 1N Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

#### BSA-Phosphatpuffer:

1000 ml Phosphatpuffer

1 g BSA

Phosphatpuffer (78,6 mM):

2,686 g Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

8,336 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0,325 g Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )

pH 7,2

ad 1000 ml Aqua dest.

konzentrierter Phosphatpuffer (393 mM):

2,686 g Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

8,336 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0,325 g Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )

pH 7,2

ad 200 ml Aqua dest.

Kohlesuspension:

2,5 g Norit A

0,25 g Dextran 60

ad 500ml Aqua dest.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Hormonbestimmungen

#### 4.1.1 Ergebnisdarstellung in Abhängigkeit vom Alter und Entnahmeort der Blutprobe

##### 4.1.1.1 Hormonkonzentrationen im peripheren Blut

Als aus dem peripheren Blut stammend wurden die Proben aus der Ohrvene (Vena auricularis magna) oder der vorderen Hohlvene (Vena cava cranialis bzw. Vena jugularis externa) definiert (s. S. 26, Kap. 3.1). Die in diesen Proben für die einzelnen Altersgruppen erhaltenen mittleren Werte sind in den Tabellen 6-9 wiedergegeben.

Tab. 6: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g(SF)$ ; nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an freiem Estron (E1) bei Ebern verschiedener Alterstufen, gemessen in der V. auricularis magna bzw. der V. cava cranialis bzw. V. jugularis externa

Altersgruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g/SF$	$\bar{X}_g*SF$	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	13	0,24	1,94	0,12	0,46	0,10	0,75
150-200	12	0,32	2,05	0,16	0,65	0,12	0,90
250-365	6	0,48	1,23	0,39	0,59	0,37	0,66
>365	6	0,84	1,62	0,52	1,35	0,40	1,61

Tabelle 6 zeigt die für E1 ermittelten Werte. Der Anstieg der mittleren Konzentrationen von 0,24 nmol/l am 100. Lebenstag auf 0,84 bei Tieren der Gruppe >365 Tage ist mit  $p < 0,001$  hoch signifikant.

Tab. 7: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Estronsulfat (E1S) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der V. auricularis magna bzw. V. cava cranialis bzw. V. jugularis externa

Altersgruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	13	5,06	4,38	1,16	22,16	0,19	53,00
150-200	12	12,66	4,50	2,81	57,01	0,44	82,50
250-365	6	15,23	4,09	3,72	62,31	2,07	81,15
>365	6	60,23	2,26	26,68	135,96	15,57	200,20

Mit Werten zwischen 5,06 nmol/l bei der Altersgruppe 100 Tage und 60,23 nmol/l bei Tieren der Gruppe >365 Lebenstage ergeben sich für E1S ca. 20-80fach höhere Werte als für freies E1. Mit  $p < 0,01$  ist auch hier der altersabhängige Anstieg von Tag 100 auf >365 Tage als signifikant erkennbar (s. Tab.7).

Tab. 8: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Testosteron (T) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der V. auricularis magna bzw. V. cava cranialis bzw. V. jugularis externa

Altersgruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	13	2,65	2,61	1,02	6,93	0,54	18,02
150-200	12	6,47	2,51	2,57	16,25	1,37	24,08
250-365	6	7,44	2,65	2,81	19,70	1,96	51,76
>365	6	14,08	1,93	7,30	27,16	5,63	42,10

Wie Tabelle 8 zeigt, steigen die mittleren Testosteronkonzentrationen von 2,65 nmol/l (Gruppe 100 Lebenstage) auf 14,08 nmol/l (Gruppe >365 Tage) an, mit  $p < 0,1$  erweist sich dieser Anstieg jedoch als nicht mehr gesichert. Größenordnungsmäßig liegen die Testosteronkonzentrationen im Bereich derer von Estronsulfat, im Mittel ergeben sich jedoch um den Faktor 2-4 niedrigere Werte.

Tab. 9: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Progesteron (P4) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der V. auricularis magna bzw. V. cava cranialis bzw. V. jugularis externa

Altersgruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	13	0,72	1,68	0,43	1,20	0,32	1,94
150-200	12	1,48	1,93	0,77	2,86	0,32	4,03
250-365	6	0,55	1,50	0,37	0,83	0,32	1,16
>365	6	1,27	1,51	0,84	1,92	0,72	2,29

Der Progesterongehalt lässt keine Altersabhängigkeit erkennen, die mittlere Konzentration über alle Altersgruppen liegt bei 0,96 (1,94) nmol/l [ $\bar{X}_g$ (SF)].

#### 4.1.1.2 Hormonkonzentrationen in der Arteria testicularis

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 10 -13 wiedergegeben. Sie zeigen, dass die in der Arteria testicularis gemessenen Werte größenordnungsmäßig den im peripheren Blut gemessenen entsprechen; anders als dort war ein Effekt des Alters (Altersabhängigkeit) statistisch jedoch für keines der erfassten Hormone nachweisbar.

Tab. 10: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an freiem Estron (E1) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der A. testicularis

Altersgruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	8	0,45	1,47	0,31	0,66	0,21	0,75
150-200	6	0,48	2,42	0,20	1,16	0,11	2,22
250-365	5	0,38	1,83	0,21	0,70	0,13	0,63
>365	2	0,70	1,48	0,47	1,03	0,47	1,03

Tab. 11: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g(SF)$ ; nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Estronsulfat (E1S) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der A. testicularis

Alters- gruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g/SF$	$\bar{X}_g*SF$	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	8	4,89	3,06	1,60	14,98	0,96	39,10
150-200	6	21,34	3,81	5,60	81,28	2,84	131,60
250-365	5	11,18	3,20	3,49	35,80	2,71	43,64
>365	2	39,13	2,11	18,54	82,60	18,54	82,60

Tab. 12: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g(SF)$ ; nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Testosteron (T) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der A. testicularis

Alters- gruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g/SF$	$\bar{X}_g*SF$	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	8	4,14	3,08	1,34	12,76	0,62	29,42
150-200	6	25,23	2,75	9,17	69,44	5,44	135,80
250-365	5	12,34	3,41	3,62	42,13	3,74	55,52
>365	2	20,52	1,19	17,20	24,47	17,20	24,47

Tab. 13: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Progesteron (P4) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der A. testicularis

Altersgruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	7	0,46	1,62	0,28	0,74	0,32	1,10
150-200	6	1,89	2,17	0,87	4,11	0,60	7,83
250-365	5	0,65	1,87	0,35	1,21	0,32	1,42
>365	2	0,96	1,06	0,90	1,02	0,90	1,02

#### 4.1.1.3 Hormonkonzentrationen in der Vena testicularis

Die Ergebnisse der Hormonmessungen in der Vena testicularis sind in den Tabellen 14-17 zusammengefasst. Die Werte liegen für alle Altersgruppen höher als die in der Arteria testicularis und im peripheren Blut gemessenen (s. auch Kap. 4.1.1.1 und 4.1.1.2); wie für die Arteria testicularis konnte ein Effekt des Alters statistisch jedoch nicht ermittelt werden. Der Tendenz nach zeigte sich jedoch zumindest für Estronsulfat ein deutlicher Anstieg in der höchsten Altersgruppe, wobei ein deutlich höheres Konzentrationsniveau als für Testosteron erreicht wurde, dessen Werte relativ konstant im Mittel bei 112,72 (4,08) nmol/l [ $\bar{X}_g$ (SF)] lagen.

Tab. 14: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an freiem Estron (E1) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der V. testicularis

Alters- gruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	6	1,10	1,95	0,56	2,14	0,45	2,88
150-200	13	1,16	2,77	0,42	3,20	0,21	5,63
250-365	4	1,44	2,01	0,72	2,90	0,57	4,02
>365	4	2,19	2,16	1,01	4,72	0,73	6,42

Tab. 15: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF);nmol/l und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Estronsulfat (E1S) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der V. testicularis

Alters- gruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	6	45,11	4,14	10,90	186,67	3,80	265,00
150-200	13	48,24	5,05	9,56	243,38	1,66	325,80
250-365	4	38,46	3,90	9,86	150,02	5,50	174,60
>365	4	221,20	2,36	93,59	522,84	91,00	883,10



Tab. 16: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g(SF)$ ; nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Testosteron (T) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der V. testicularis

Alters- gruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g/SF$	$\bar{X}_g*SF$	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	6	113,72	3,60	31,56	409,78	19,05	789,00
150-200	13	100,42	5,04	19,93	505,93	1,43	845,00
250-365	4	179,00	3,96	45,19	709,03	16,94	524,50
>365	4	101,95	1,63	62,60	166,06	47,90	185,60

Tab. 17: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g(SF)$ ; nmol/l] und Spannweiten ( $X_{\min}$ ,  $X_{\max}$ ) an Progesteron (P4) bei Ebern verschiedener Altersstufen, gemessen in der V. testicularis

Alters- gruppen in Tagen	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g/SF$	$\bar{X}_g*SF$	$X_{\min}$	$X_{\max}$
100	6	1,65	1,82	0,91	3,01	0,48	3,08
150-200	13	2,18	2,21	0,99	4,80	0,61	12,62
250-365	4	1,50	2,44	0,61	3,67	0,48	5,57
>365	4	3,89	1,71	2,28	6,64	1,73	6,38

#### 4.1.2 Gegenüberstellung der im peripheren Blut und der testikulären Zirkulation gemessenen Hormonwerte

In Tabelle 18 sind die mittleren im peripheren Blut sowie der testikulären Zirkulation (Arteria und Vena testicularis) gemessenen Hormonwerte einander gegenübergestellt.

Tab. 18: Gegenüberstellung der in den verschiedenen Gefäßen gemessenen durchschnittlichen Hormonkonzentrationen [ $\bar{X}_g(SF)$ ]; Angaben in nmol/l; n = Anzahl der Proben

Hormon	Altersgruppe in Tagen	Periphere Zirkulation		Testikuläre Zirkulation			
				A. testic.		V. testic.	
		$\bar{X}_g(SF)$	n	$\bar{X}_g(SF)$	n	$\bar{X}_g(SF)$	n
Estron	100	0,24 (1,94)	13	0,45 (1,47)	8	1,10 (1,95)	6
	150-200	0,32 (2,05)	12	0,48 (2,42)	6	1,16 (2,77)	13
	250-365	0,48 (1,23)	6	0,38 (1,83)	5	1,44 (2,01)	4
	>365	0,84 (1,62)	6	0,30 (1,48)	2	2,19 (2,16)	4
Estronsulfat	100	5,06 (4,38)	13	4,89 (3,06)	8	45,11 (4,14)	6
	150-200	12,66 (4,50)	12	21,34 (3,81)	6	48,24 (5,05)	13
	250-365	15,23 (4,09)	6	11,18 (3,20)	5	38,46 (3,90)	4
	>365	60,23 (2,26)	6	39,13 (2,11)	2	221,20 (3,36)	4
Testosteron	100	2,65 (2,61)	13	4,14 (3,08)	8	113,72 (3,60)	6
	150-200	6,47 (2,51)	12	25,23 (2,75)	6	100,42 (15,04)	13
	250-365	7,44 (2,65)	6	12,34 (3,41)	5	179,00 (3,96)	4
	>365	14,08 (1,93)	6	20,52 (1,19)	2	101,95 (1,63)	4
Progesteron	100	0,72 (1,68)	13	0,46 (1,62)	7	1,65 (1,82)	6
	150-200	1,48 (1,93)	12	1,89 (2,17)	6	2,18 (2,21)	13
	250-365	0,55 (1,50)	6	0,65 (1,87)	5	1,50 (2,44)	4
	>365	1,27 (1,51)	6	0,96 (1,06)	2	3,89 (1,71)	4

Tabelle 18 zeigt, dass sich - gemessen an den mittleren Konzentrationen - für jedes Hormon und jeden Zeitpunkt positive arteriovenöse Differenzen für die in der testikulären Zirkulation gemessenen Werte ergeben. Diese Beobachtung war mit  $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,01$  allerdings nur für die 100-Tage-Gruppe „Estron“ und „Progesteron“ signifikant (s. Tab 49, Tabellenanhang). Für Estron, Estronsulfat und Progesteron ergeben sich keine Unterschiede zwischen den in der Arteria testicularis und der peripheren Zirkulation gemessenen Werten, alternierend werden in dem einen oder anderen Gefäß höhere oder niedrigere, jedoch im gleichen Meßbereich liegende, Werte gemessen.

Für Testosteron fällt dagegen auf, dass die für die Arteria testicularis errechneten Mittelwerte stets höher liegen als in der peripheren Zirkulation; diese Beobachtung ist allerdings mit  $p < 0,1$  statistisch nicht mehr signifikant.

Tabelle 19 gibt an, inwieweit der Verlauf der vier erfassten Steroide zwischen den einzelnen Gefäßen korreliert ist. Wie daraus hervorgeht, ergibt sich mit  $p < 0,01$  bis  $p < 0,001$  eine hoch signifikante Korrelation im Verlauf der vier erfassten Steroide zwischen „Peripherie“ und Arteria testicularis; die Korrelation mit den in der Vena testicularis gemessenen Hormonkonzentrationen war dagegen für Estron nicht signifikant.

Innerhalb der testikulären Zirkulation ergab sich eine gesicherte Korrelation lediglich für den Verlauf der Progesteron- und Estronsulfatkonzentrationen.

Tab. 19: p-Werte für die Korrelation des Verlaufs von Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron zwischen der peripheren und testikulären Zirkulation und innerhalb der testikulären Zirkulation

Hormone	Gefäß		
	Peripherie		Arteria testicularis
	vs. A. testicul.	vs. V. testicul.	vs. V. testicul.
Estron	$p < 0,001$	n.s.	n.s.
Estronsulfat	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Testosteron	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.
Progesteron	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$

Angaben zur Korrelation des Verlaufs von Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron bezüglich des Ortes der Blutentnahme finden sich in den Tabellen 20-22.

Tab. 20: p-Werte für die Korrelation des Verlaufs an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron innerhalb der peripheren Zirkulation (V. auricularis magna bzw. V. cava cranialis bzw. V. jugularis externa)

Periphere Zirkulation	E1S	T	P4
E1	n.s.	p<0,001	n.s.
E1S	-/-	p<0,001	n.s.
T	-/-	-/-	n.s.

Tab. 21: p-Werte für die Korrelation des Verlaufs an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron innerhalb der A. testicularis

A. testicularis	E1S	T	P4
E1	n.s.	n.s.	n.s.
E1S	-/-	p<0,001	n.s.
T	-/-	-/-	n.s.

Tab. 22: p-Werte für die Korrelation des Verlaufs an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron innerhalb der V. testicularis

V. testicularis	E1S	T	P4
E1	p<0,001	p<0,001	p<0,001
E1S	-/-	p<0,01	p<0,001
T	-/-	-/-	n.s.

Wie Tabelle 20 zeigt, korreliert in der peripheren Zirkulation der Verlauf der Konzentration an Testosteron hoch signifikant mit dem Verlauf von E1 und E1S. Dagegen ergibt sich zwischen dem Verlauf der beiden Östrogene mit p<0,1 keine gesicherte Korrelation, auch der Verlauf der Progesteronkonzentration läßt keine Beziehungen zu den anderen drei Steroiden erkennen.

Für die in der Arteria testicularis gemessenen Hormonkonzentrationen ergibt sich, dass der Verlauf von E1S und T signifikant korreliert (s. Tab. 21).

In der Vena testicularis ergibt sich dagegen lediglich für den Verlauf von P4 und T keine gesicherte Korrelation.

#### 4.1.3 Hormonkonzentrationen im Seminalplasma geschlechtsreifer Eber

Diese Untersuchung schloss Eber im Alter zwischen 329 und 2793 Lebenstagen ein; gemessen wurden Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Mittlere Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron im Seminalplasma geschlechtsreifer Eber

gemessenes Steroid	n	$\bar{X}_g$	SF	$\bar{X}_g$ /SF	$\bar{X}_g$ *SF	$X_{\min}$	$X_{\max}$
E1	21	0,64	4,87	0,13	3,12	0,10	45,35
E1S	21	3,14	3,28	0,96	10,28	0,19	17,70
T	20	1,22	2,20	0,55	2,69	0,23	8,66
P4	20	0,39	1,41	0,28	0,55	0,32	1,09

Tabelle 24 gibt eine vergleichende Darstellung der im Seminalplasma gemessenen Werte mit den im Blutplasma gemessenen der Eber aus der Gruppe >365 Lebenstage. Dabei zeigt sich, dass die Konzentrationen im Seminalplasma am niedrigsten liegen. Dieser Unterschied war mit  $p < 0,0001$  (unpaarer t-Test) für Estronsulfat, Testosteron und Progesteron in allen Gefäßen hochsignifikant.

Tab. 24: Im Seminalplasma und bei Ebern >365 Tagen im Blutplasma gemessene Konzentrationen an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron [ $\bar{X}_g(SF)$ ; nmol/l]

Hormon	Seminalplasma	Blutplasma		
		Periphere Zirkulation	Arteria testicularis	Vena testicularis
Estron	0,64 (4,87)	0,84 (1,62)	0,30 (1,48)	2,19 (2,16)
Estronsulfat	3,14 (3,28)	60,23 (2,26)	39,13 (2,11)	221,20 (3,36)
Testosteron	1,22 (2,20)	14,08 (1,93)	20,52 (1,19)	101,95 (1,63)
Progesteron	0,39 (1,41)	1,27 (1,51)	0,96 (1,06)	3,89 (1,71)

#### 4.2 Nach der „High Performance Liquid Chromatography (HPLC)“ ermittelte Konzentrationen an freiem und konjugiertem Estradiol-17 $\beta$ und Estron in Blut und Seminalplasma geschlechtsreifer Eber

Nachdem das verwendete Antiserum zur Bestimmung von Estradiol mit Estron eine Kreuzreaktion von 1,3 % (s. Tab.5) aufweist, war davon auszugehen, dass bei einem hohen Estronüberschuss eine sichere Bestimmung von Estradiol-17 $\beta$  mittels RIA nach einfacher Extraktion nicht mehr möglich ist.

Zum Nachweis, ob Estradiol-17 $\beta$  überhaupt als testikuläres Sekretionsprodukt in Erscheinung tritt, war es daher Ziel dieses Tastversuches, die beiden Steroide vor der Bestimmung im RIA chromatographisch zu trennen.

Die Untersuchungen wurden an Seminalplasma von vier Ebern („Willie“, „Fred“, „Zito“ und „Frucht“), sowie Blutproben aus der Vena auricularis magna und der Vena testicularis von acht geschlechtsreifen Tieren (Eber 2-200d, Eber 3-200d, Eber 6-200d, Eber 3-250d, Eber 1>200d, Eber 2>200d, Eber 3 und Eber 4) durchgeführt.

Als Kontrollen dienten zwei Plasmaproben mit einem bekannt niedrigen (Kontrollplasma 1) bzw. hohen (Kontrollplasma 2) Östrogengehalt. Für diese Proben ergab sich die in Tabelle 24 dargestellte Wiederfindung (absolut und relativ).

Tab. 25: Mittlere Wiederfindungen von Estron und Estradiol-17 $\beta$  nach chromatographischer Auftrennung mittels HPLC

Probe	Estron (fmol/100 $\mu$ l)			Estradiol-17 $\beta$ (pg/100 $\mu$ l)		
	V <sup>1)</sup>	F <sup>2)</sup>	% Wdf <sup>3)</sup>	V	F	% Wdf
Kontrolle 1	628	280	45	16,1	8,3	52
Kontrolle 2	1875	1534	82	26,1	16,7	64

- 1) V = Vorlagenmenge
- 2) F = wiedergefundene Hormonmenge
- 3) % Wdf = Wiederfindung in Prozent

Daraus ergibt sich, dass die Wiederfindung insgesamt eine hohe Variabilität aufwies, so dass sich ein Korrekturfaktor daraus nicht ableiten ließ. Die erhaltenen Ergebnisse gestatten daher nur die qualitative Aussage, dass neben Estron auch Estradiol-17 $\beta$  eindeutig nachgewiesen werden konnte, wobei – analog zu Estron – konjugiertes Estradiol-17 $\beta$  deutlich höher liegt als freies (siehe Tabelle 26).

Tab. 26: Mittels HPLC-RIA gemessene Östrogen-Konzentrationen [ $\bar{X}_g$ (SF); nmol/l] im Blut und im Seminalplasma

nmol/l	V. auricularis/cava (n=8)	V. testicularis (n=8)	Seminalplasma (n=4)
E1 frei	0,18 (1,51)	0,90 (2,16)	0,94 (4,01)
E1 konjugiert	5,61 (4,74)	34,60 (3,10)	4,45 (1,71)
E2 frei	0,08 (3,38)	1,17 (3,30)	0,13 (10,36)
E2 konjugiert	0,45 (8,03)	9,74 (4,33)	0,36 (3,51)



### **4.3 Tastversuche zur Erfassung der Östrogensulfotransferase (OST) und der Arylsulfatase C (ASC) -Aktivität**

#### **4.3.1 Untersuchungen zur Aktivität der Östrogensulfotransferase (OST) in Gewebehomogenaten von Hoden und Nebenhoden**

In diesen Tastversuchen sollte ermittelt werden, inwieweit  $^3\text{H}$ -Estron (s. Kap.3.3.4) nach Zugabe zu den Homogenaten in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat umgesetzt wird und damit auf das Vorhandensein einer Östrogensulfotransferase-Aktivität geschlossen werden kann. Bei diesen Untersuchungen blieben die endogenen Konzentrationen an Estron unberücksichtigt, so dass die Ergebnisse nicht in Mol/mg Protein sondern in % Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat angegeben werden.

##### **4.3.1.1 Untersuchungen ohne Zusatz des Cofaktors**

Die Untersuchungen wurden mit Homogenaten von 6 geschlechtsreifen Ebern der 150-200 Tage-Gruppe durchgeführt (Eber 1,2,3-150d und 1,2,3-200d).

Wie Tabelle 27 zeigt, ergibt sich bei den Inkubationen von Hodenhomogenat zwischen dem Gewebeleerwert und dem nach 60 Minuten erhaltenen Ergebnis praktisch kein Unterschied, eine OST-Aktivität ist somit nicht nachweisbar. Bei der Verwendung von Nebenhodenhomogenat konnte dagegen eine zeitabhängige Substratumwandlung aufgezeigt werden, die mit  $p < 0,0001$  hochsignifikant war (s. Tab. 28 und Abb. 5).

Tab. 27: OST-Aktivität in Hodenhomogenaten geschlechtsreifer Eber (n=6), gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat ( $\bar{X}/\text{SD}$ , Spannweite  $X_{\min} - X_{\max}$ )

Inkubationsdauer in Minuten	Umwandlung in %			
	$\bar{X}$	SD	$X_{\min}$	$X_{\max}$
Mediumleerwert <sup>1</sup>	3,14	0,66	2,11	3,81
Gewebeleerwert <sup>1</sup>	5,07	2,77	2,88	10,24
0	3,70	0,94	2,65	5,15
5	3,39	0,44	3,06	4,16
15	4,19	1,49	2,63	6,47
30	4,96	2,41	1,92	8,89
60	5,25	1,17	3,95	6,93

<sup>1)</sup> Meßwert nach 60 Minuten Inkubationsdauer

Tab. 28: OST-Aktivität in Nebenhodenhomogenaten geschlechtsreifer Eber (n=6), gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat ( $\bar{X}/\text{SD}$ , Spannweite  $X_{\min} - X_{\max}$ )

Inkubationsdauer in Minuten	Umwandlung in %			
	$\bar{X}$	SD	$X_{\min}$	$X_{\max}$
Mediumleerwert <sup>1</sup>	3,14	0,66	2,11	3,81
Gewebeleerwert <sup>1</sup>	2,67	0,70	1,91	4,03
0	2,94	0,58	2,14	3,84
5	4,65	0,99	3,24	5,70
15	6,13	1,22	4,58	7,38
30	8,81	2,44	5,55	11,85
60	9,90	3,11	7,07	15,33

<sup>1)</sup> Meßwert nach 60 Minuten Inkubationsdauer

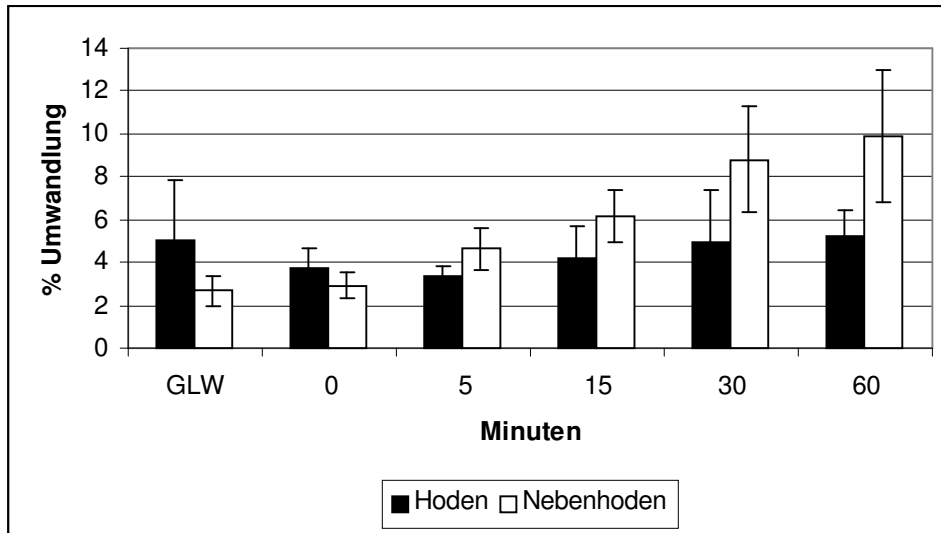


Abb. 5: OST-Aktivität in Hoden- und Nebenhodenhomogenaten geschlechtsreifer Eber (n=6), gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )

#### 4.3.1.2 Untersuchungen nach Zusatz des Cofaktors PAPS (3'Phosphoadenosin-5'Phosphosulfat)

Dieser Versuch wurde vergleichend mit und ohne PAPS-Zusatz durchgeführt. Herangezogen wurden Hoden und Nebenhoden der 200 Tage-Eber E1-, E2- und E3.

Das Ergebnis zeigen Tabelle 28 und Abbildung 6. Daraus ist ersichtlich, dass sich bei dem Nebenhodenhomogenat, nicht jedoch bei dem Hodenhomogenat, nach Zugabe von PAPS eine hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Steigerung der Umsetzung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat ergab; das Reaktionsgleichgewicht war nach annähernd 15 Minuten erreicht.

Tab. 29: OST-Aktivität im Hoden- und Nebenhodenhomogenat (n=3) mit und ohne Zugabe des Cofaktors PAPS. Angabe der Enzymaktivitäten in % Substratumwandlung [ $\bar{X}$ /SD]

Inkubationszeit	Inkubationsansatz			
	ohne PAPS		mit PAPS	
	Hoden	Nebenhoden	Hoden	Nebenhoden
Mediumleerwert <sup>1</sup>	2,77 / 0,74	2,77 / 0,74	2,94 / 0,31	2,94 / 0,31
Gewebeleerwert <sup>1</sup>	3,32 / 0,10	2,10 / 0,15	3,98 / 1,17	2,50 / 0,65
0 Minuten	3,14 / 0,43	2,63 / 0,53	3,70 / 1,53	7,97 / 2,06
5 Minuten	3,13 / 0,11	4,27 / 1,27	3,41 / 0,16	29,24 / 2,34
15 Minuten	4,05 / 2,11	5,62 / 1,41	5,18 / 2,04	38,80 / 10,21
30 Minuten	4,87 / 3,61	8,29 / 3,23	4,91 / 0,74	33,45 / 11,91
60 Minuten	4,25 / 0,28	8,15 / 0,96	5,85 / 1,28	44,15 / 9,95

<sup>1)</sup> Meßwert nach 60 Minuten Inkubationsdauer

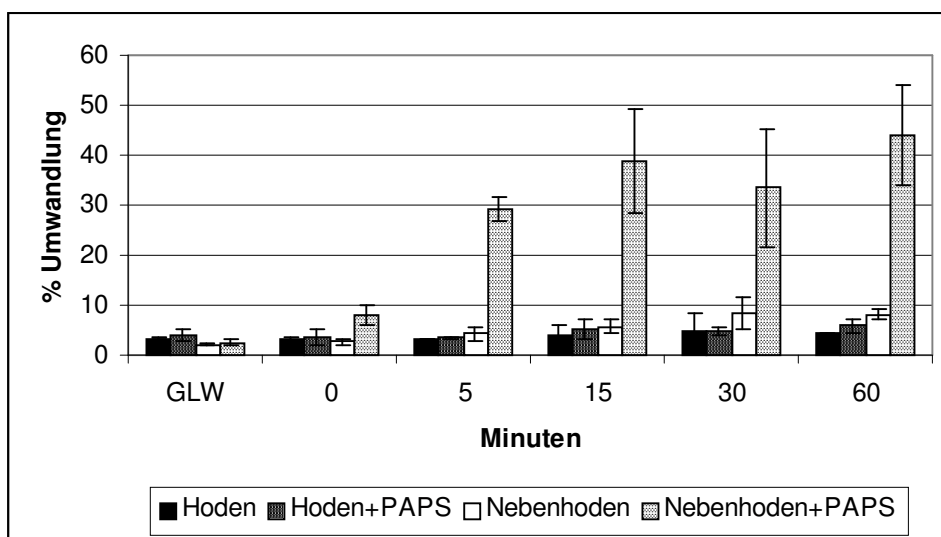


Abb. 6: OST-Aktivität in Hoden- und Nebenhodenhomogenaten geschlechtsreifer Eber (n=3) ohne und mit Zugabe des Cofaktors PAPS, gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )

#### 4.3.1.3 Weiterführende Untersuchungen zur OST-Aktivität im Nebenhoden

Nachdem in den bisherigen Untersuchungen ein Gesamthomogenat aus Nebenhodenkopf, Nebenhodenkörper mit Anteilen des Nebenhodenschwanzes verwendet worden war, sollte in einem weiteren Tastversuch zwischen Nebenhodenschwanz und Nebenhodenkopf /-körper differenziert werden.

Die Untersuchungen wurden unter Zugabe des Cofaktors PAPS durchgeführt, herangezogen wurde der Eber 2-200d.

Wie aus Tabelle 30 hervorgeht, war in diesem Versuch die OST-Aktivität im Nebenhodenkopf /Nebenhodenkörper deutlich höher ausgeprägt als im Nebenhodenschwanz..

Tab. 30: OST-Aktivität in Homogenaten „Nebenhodenkopf/-körper (NHK)“ und „Nebenhodenschwanz (NHS)“ des Ebers 2-200d bei Zugabe des Cofaktors PAPS zum Inkubationsmedium, gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estron in  $^3\text{H}$ -Estronsulfat

Inkubationszeit	% Umw. NHK	% Umw. NHS
Mediumleerwert <sup>1)</sup>	2,52	2,52
Gewebeleerwert	1,86	2,28
0 Minuten	8,50	3,62
5 Minuten	26,91	7,62
15 Minuten	50,51	20,85
30 Minuten	46,54	21,01
60 Minuten	55,45	19,85

<sup>1)</sup> Meßwert nach 60 Minuten Inkubationsdauer

### 4.3.2 Untersuchungen zur Aktivität der Arylsulfatase C (ASC) in Gewebehomogenaten von Hoden und Nebenhoden

In diesen Versuchen sollten über die Hydrolyse von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat in  $^3\text{H}$ -Estron Hinweise auf das Vorhandensein einer Arylsulfatase C-Aktivität erhalten werden. Die endogenen Hormonkonzentrationen im Homogenat blieben dabei unberücksichtigt, so dass auch hier das Ergebnis nicht in Mol/mg Protein sondern in % Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat in  $^3\text{H}$ -Estron angegeben ist.

Die Untersuchungen wurden an dem gleichen Probenmaterial und parallel zur Bestimmung der OST-Aktivität durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 31 und 32 sowie in Abbildung 7 zusammengefasst.

Tab. 31: Arylsulfatase C (ASC-) Aktivität in Hodenhomogenaten geschlechtsreifer Eber (n = 6), gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat in  $^3\text{H}$ -Estron ( $\bar{X}/\text{SD}$ , Spannweite  $X_{\min} - X_{\max}$ )

Inkubationsdauer in Minuten	Umwandlung in %			
	$\bar{X}$	SD	$X_{\min}$	$X_{\max}$
Mediumleerwert <sup>1)</sup>	2,30	0,12	2,14	2,48
Gewebeleerwert <sup>1)</sup>	18,70	7,55	9,34	27,10
0	28,94	4,08	21,70	32,84
5	58,54	9,58	41,00	68,06
15	81,38	3,57	76,79	85,75
30	85,77	5,88	74,09	89,64
60	88,23	2,82	82,98	91,42

<sup>1)</sup> Meßwert nach 60 Minuten Inkubationsdauer

Tab. 32: Arylsulfatase C (ASC-) Aktivität in Nebenhodenhomogenaten geschlechtsreifer Eber (n = 6), gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat in  $^3\text{H}$ -Estron ( $\bar{X}/\text{SD}$ , Spannweite  $X_{\min} - X_{\max}$ )

Inkubationsdauer in Minuten	Umwandlung in %			
	$\bar{X}$	SD	$X_{\min}$	$X_{\max}$
Mediumleerwert <sup>1)</sup>	2,30	0,12	2,14	2,48
Gewebeleerwert <sup>1)</sup>	16,56	5,21	8,23	24,84
0	21,52	5,22	13,18	26,53
5	28,27	7,66	17,55	36,94
15	34,50	8,68	21,71	46,16
30	40,98	12,31	21,37	55,05
60	46,73	9,83	30,99	61,28

<sup>1)</sup> Meßwert nach 60 Minuten Inkubationsdauer

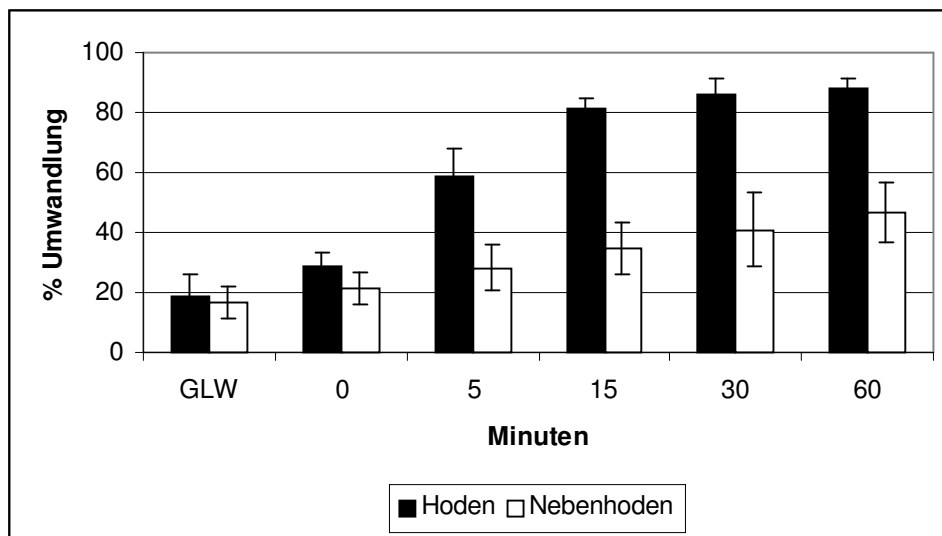


Abb. 7: ASC-Aktivität in Hoden- und Nebenhodenhomogenaten geschlechtsreifer Eber (n=6), gemessen an der prozentualen Umwandlung von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat in  $^3\text{H}$ -Estron ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )

Bei den erhaltenen Ergebnissen fällt auf, dass im Hoden und Nebenhoden beim Gewebeleerwert Substratumsetzungen zwischen 8,2% bis 27,1% gemessen wurden, bereits mit Beginn der Inkubation (0 Minuten) ergaben sich mittlere Ausgangswerte von  $21,52 \pm 5,22\%$  (Nebenhoden, Tab. 32) und  $28,94 \pm 4,08\%$  (Hoden, Tab. 31)

Substratumwandlung. Am Ende der Inkubationszeit waren mittlere Substratumsetzungen von ca. 88% (Hoden) und 47% (Nebenhoden) erreicht worden, d.h. der Ausgangswert wurde etwa um den Faktor 3 bzw. 2 überschritten. Die zeitabhängige Substratumsetzung war für beide Gewebe mit  $p < 0,0001$  hochsignifikant.

Während bei der Verwendung von Hodenhomogenat nach ca. 15 Minuten das Reaktionsgleichgewicht erreicht war, konnte ein solches bei der Inkubation mit Nebenhodengewebe offensichtlich nicht erzielt werden.

#### **4.3.3 Untersuchungen zur Stabilität von OST und ASC**

Bei jedem Inkubationsansatz wurden, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, ein Medium- und Gewebeleerwert als Kontrolle angesetzt.

Mit  $3,14 \pm 0,66\%$  Substratumwandlung ( $\bar{X} \pm SD$ ;  $n=6$ ) im Mediumleerwert und  $5,07 \pm 2,77\%$  Umwandlung im Gewebeleerwert Hoden bzw.  $2,67 \pm 0,70\%$  im Nebenhoden ( $\bar{X} \pm SD$ ;  $n=6$ ), wurden bei Bestimmung der OST-Aktivität Werte erhalten, die im Erwartungsbereich lagen und auf eine vollständige Inaktivierung des Enzyms durch die Hitzevorbehandlung schließen lassen.

Entsprechend ergab sich bei der Bestimmung der ASC-Aktivität für den Mediumleerwert ein Wert von  $2,30 \pm 0,20\%$  Substratumwandlung ( $\bar{X} \pm SD$ ;  $n=6$ ).

Für den Gewebeleerwert wurden dagegen mit  $18,70 \pm 7,55\%$  bzw.  $16,56 \pm 5,21\%$  Substratumwandlung bei Hodenhomogenat bzw. Nebenhodenhomogenat deutlich höhere Werte gemessen.

Anhand des Mediumleerwertes zeigt dieses Ergebnis zunächst, dass das angebotene  $^3\text{H}$ -E1S ausreichend stabil ist, dass es aber offensichtlich nicht gelang, durch die getroffenen Maßnahmen (u.a. Erhitzen des Gewebes für 20 Minuten bei  $120^\circ\text{C}$  im Sandbad) die ASC komplett zu inaktivieren.

Ausgangswert bei Erfassung der Enzymaktivität musste daher der jeweilige 0-Minuten-Wert sein.



## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Diskussion der Methodik**

#### **5.1.1 Versuchsaufbau**

Die Untersuchungen wurden an Ebern durchgeführt, die sowohl als Patienten zur Kastration in der Klinik vorgestellt wurden, als auch an Tieren, bei denen im Hinblick auf die vorgegebene Fragestellung der Zeitpunkt der vorgesehenen Kastration terminlich festgelegt wurde. Im Vordergrund der Maßnahme stand die Kastration; im Hinblick darauf war es nicht immer möglich, parallel dazu aus den vorgesehenen Blutgefäßen (Arteria und Vena testicularis, Vena auricularis magna oder Vena cava cranialis bzw. Vena jugularis externa) Blutproben zu gewinnen. Bei der statistischen Auswertung konnte daher nicht von gepaarten Proben ausgegangen werden, was einen gewissen Verlust hinsichtlich der Schärfe der Aussage bedeutet. Die errechneten Signifikanzen zeigen jedoch, dass jeweils eine ausreichend hohe Stichprobenzahl erreicht wurde, um zu aussagefähigen Ergebnissen zu kommen. Während aufgrund des gewonnenen Probenmaterials eine Aussage bezüglich der Altersabhängigkeit, der erfassten Hormonkonzentrationen und damit der testikulären Steroidhormonsynthese sowie der testikulären OST- und ASC-Aktivitäten gemacht werden kann, gilt dies nicht für das Seminalplasma. Alle untersuchten Seminalplasmaproben stammten von im Zuchtgeschäft stehenden Ebern, so dass die erhaltenen Werte grundsätzlich nur für geschlechtsreife Tiere gelten.

#### **5.1.2 Radioimmunologische Hormonanalytik**

Zur Bestimmung von Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron wurde auf im Labor etablierte Routineverfahren zurückgegriffen, für welche die entsprechenden „SOP’s“ zur Verfügung standen. Es handelte sich dabei jeweils um Verfahren, denen eine Extraktion des Steroids aus dem Probenplasma und die unmittelbar darauf folgende radioimmunologische Messung zugrunde lagen. Während mit diesen Verfahren den an die Zuverlässigkeit der Methodik zu stellenden Ansprüchen entsprochen wurde, kann dies nicht für die Erfassung von Estron und Estradiol-17 $\beta$  nach vorheriger Auftrennung mittels HPLC gesagt werden. Dieses Verfahren sollte an einem limitierten Probenmaterial von geschlechtsreifen Ebern angewendet

werden, um spezifisch Estradiol erfassen zu können. Hier sollte die Erfahrung berücksichtigt werden, dass bei nur gering ausgeprägten Konzentrationen des Analyten, und einem deutlichen Überschuss eines kreuz-reagierenden Liganden, falsch positive Werte erzielt werden können. Das für vorliegende Untersuchungen verfügbare Antiserum gegen Estradiol-17 $\beta$  wies mit Estron eine Kreuzreaktion von 1,3% auf (s. S. 42). Wie Kapitel 4.2 zeigt, wurden bei der Bestimmung von Estradiol die Anforderungen an die Zuverlässigkeit nur sehr eingeschränkt erfüllt, so dass lediglich die Aussage getroffen werden kann, dass freies Estradiol-17 $\beta$  in Konzentrationen um 1 nmol/l, konjugiertes bis zu ca. 10 nmol/l nachweisbar waren. Im Hinblick auf den Teilaspekt der hier zugrunde liegenden Fragestellung, wurde auf weiterführende Untersuchungen verzichtet.

### **5.1.3 Bestimmung von OST und ASC**

#### **5.1.3.1 Verwendung von Gewebekomogenaten**

Ziel vorliegender Untersuchungen war es, zusätzliche qualitative Informationen über das Vorkommen einer Aktivität der Enzyme OST und ASC in Hoden und Nebenhoden von Ebern zu erhalten; auf die Art der für die Enzymsynthese verantwortlichen Zellen und die subzelluläre Lokalisation des Enzyms kann jedoch nicht geschlossen werden.

Demzufolge könnten bei Verwendung von Hodenkomogenaten sowohl die Interstitialzellen als auch die Zellen des Keimepithels als Orte der OST- und ASC-Synthese in Frage kommen. Auch bei den Nebenhodenkomogenaten kann nicht ausgeschlossen werden, dass Spermien an einer eventuellen Enzymsynthese beteiligt sind, da trotz der durchgeführten Spülungen von einer Restmenge an Spermien im Komogenat auszugehen ist.

Diese Feststellungen weisen auf die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen hin.

### 5.1.3.2 Arylsulfatase C

Bei Verwendung von  $^3\text{H}$ -E1S als Substrat zur Darstellung einer ASC-Aktivität wurde auf Erfahrungen von der Bestimmung der ASC-Aktivität in der Plazenta vom Rind zurückgegriffen (Hoffmann et al., 2001).

Wie die erhaltenen Ergebnisse zeigen, war der zeitliche Verlauf der Substratumsetzung, und demnach eine Enzymaktivität, gut darstellbar. Auch die im Bereich von 2-3% Umwandlung liegenden Mediumleerwerte entsprechen den Erwartungen im Hinblick auf Reinheit und Stabilität des angebotenen  $^3\text{H}$ -Substrates ( $^3\text{H}$ -E1S).

Unerklärt muss hingegen die Beobachtung bleiben, warum bei hitzevorbehandelten Gewebeleerwerten (s. Kap.3.3.3) ein Durchschnittswert von 16,56 % Substratumwandlung gemessen wurde. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass der enzymatischen Hydrolyse eine rasch ablaufende chemische Teil-Hydrolyse vorausgegangen ist.

### 5.1.3.3 Östrogensulfotransferase

Aufbauend auf Erfahrungen von Hoffmann et al. (2001) wurde auch in vorliegenden Versuchen zur Darstellung einer OST-Aktivität die ebenfalls vorhandene ASC kompetitiv durch Zusatz von 4-NPS gehemmt. Darüber hinausgehend wurden die Untersuchungen mit und ohne PAPS als Cofaktor durchgeführt.

Wie die Untersuchungen mit Homogenaten von Nebenhoden zeigten, gelang die Darstellung einer OST-Aktivität bereits ohne PAPS-Zusatz, nach Zusatz kam es jedoch in den Ansätzen mit Nebenhodenhomogenaten zu einer Steigerung um mehr als das Zehnfache ( $p < 0,0001$ ). Diese Beobachtung weist auf die Eignung der gewählten Inkubationsbedingungen hin. Die Tatsache, dass im Hodenhomogenat eine OST-Aktivität praktisch nicht nachweisbar war, lässt demnach darauf schließen, dass eine solche im Hoden nicht oder im Vergleich zum Nebenhoden in praktisch nicht messbaren Mengen exprimiert wird.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Steroidhormone im Blut- und Seminalplasma

Für alle vier gemessenen Hormone Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron ergaben die Messungen in der testikulären Zirkulation arteriovenöse Differenzen. Für Estron, Estronsulfat und Testosteron bestätigt dies die Ergebnisse früherer Untersuchungen (Claus und Hoffmann, 1980, Setchell et al., 1983); die Tatsache, dass sich eine Signifikanz ( $p < 0,001$ ) lediglich für Estronsulfat und nicht auch für Estron und Testosteron ergab, kann auf die hohe Variabilität der erhaltenen Messwerte zurückgeführt werden, ersichtlich aus den Streufaktoren, die zwischen 1,1 und 5,05 schwanken (s. Tab. 6-17). Wie für Estronsulfat ergab sich auch für Progesteron mit  $p < 0,01$  eine signifikante arteriovenöse Differenz. Diesbezügliche Angaben konnten in der Literatur nicht ermittelt werden; es scheint demnach, dass in vorliegenden Untersuchungen erstmals diese Beobachtung gemacht werden konnte. Sie weist darauf hin, dass Progesteron offensichtlich nicht nur als Intermediärprodukt der testikulären Steroidhormonsynthese fungiert, sondern dass ihm beim Eber eine eigenständige biologische Bedeutung zukommt. Im Hinblick auf die niedrigen Konzentrationen in der peripheren Zirkulation ist davon auszugehen, dass es sich dabei jedoch eher um parakrine, autokrine Wirkungen auf testikulärer Ebene als um periphere endokrine Wirkungen handelt.

Dazu durchgeführte Untersuchungen von Riesenbeck et al. (2001) und Kohler (2004) haben gezeigt, dass im Keimepithel der Progesteronrezeptor in Spermatogonien exprimiert wird, diese Expression sich jedoch bei der weiteren Entwicklung zur Spermatozyte erster Ordnung verliert. Dies lässt auf die unterstellte parakrine Wirkung von Progesteron schließen.

In vorliegenden Untersuchungen kamen Eber im Alter von 100 bis zu >365 Tagen, also vom unmittelbar präpubertären / pubertären Zustand bis zum voll ausgewachsenen, geschlechtsreifen Tier zur Untersuchung. Ein altersbedingter Anstieg der testikulären Steroidsekretion ließ sich bei diesen Tieren praktisch nur noch in der peripheren Zirkulation und dort auch nur noch für Estron und Estronsulfat als ein signifikanter Effekt ( $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ ) darstellen. Der Anstieg von Testosteron, bezogen auf die mittleren Werte, war zwar ebenfalls noch erkennbar, aber bereits nicht mehr signifikant. Kein Alterseffekt zeigte sich für Progesteron.

Obwohl die in der Arteria testicularis gemessenen Werte weitgehend denen in der Peripherie entsprachen, ergab sich über alle Altersgruppen hinweg kein Zeiteffekt mehr. Allerdings wird bei Testosteron und Estronsulfat ein plötzlicher Anstieg von der Altersgruppe 100 Tage auf die Altersgruppe 150-200 Tage deutlich. Dieser Unterschied war für beide Steroide jedoch nicht signifikant. Wie in der Arteria testicularis konnten auch in der Vena testicularis über die Altersgruppen hinweg keine zeitlichen, altersbedingten Beziehungen mehr erkannt werden. Auffallend ist lediglich der deutlich erhöhte Wert für Estronsulfat bei der Altersgruppe >365 Tage. Wie sich aus den Tabellen 6 bis 17 ergibt, ergeben sich für die geometrischen Mittelwerte stark schwankende Minimal- und Maximalwerte, was sich auch in den Streufaktoren manifestiert, wobei sich in der Vena testicularis sogar ein Wert von 5,05 ergab. Dies lässt auf eine eher diskontinuierliche Hormonfreisetzung testikulärer Steroide schließen, was als Erklärung herangezogen werden könnte, dass in der Vena testicularis altersabhängige Unterschiede bei dem untersuchten Tierkollektiv nicht mehr erkennbar waren. Dass sich diese dann in der peripheren Zirkulation besser manifestieren, kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass der periphere Kreislauf als eine Art „Windkessel“ funktioniert und Schwankungen in der testikulären Steroidsekretion dadurch aufgefangen werden. Diese Spekulation würde zunächst erwarten lassen, dass sich ein entsprechender altersabhängiger Anstieg, zumindest von Estronsulfat und Testosteron, auch in der Arteria testicularis zeigt. Wie aus den Tabellen 7 und 11 (Estronsulfat) und 8 und 12 (Testosteron) hervorgeht, liegen die Konzentrationen zwar im gleichen Größenbereich, ein altersabhängiger Anstieg ließ sich der Tendenz nach jedoch nur für Estronsulfat erkennen. Bei Testosteron fällt weiter auf, dass beim paarweisen Vergleich die mittleren Testosteronkonzentrationen in der Arteria testicularis zwischen zwei- bis viermal höher waren als in der peripheren Zirkulation.

Für Estronsulfat kann dieses Fehlen eines altersabhängigen Anstieges möglicherweise damit erklärt werden, dass die oben angesprochene „Windkesselfunktion“ bei Erfassung der Hormonkonzentrationen in der peripheren Zirkulation bei Messung in der Arteria testicularis aufgrund der vorgeschalteten arteriellen Versorgung von Leber und anderen Organsystemen nicht mehr gegeben ist. Für die im Mittel signifikant erhöhten Testosteronwerte in der Arteria testicularis könnte ein Erklärungsversuch dahingehend lauten, dass aufgrund der engen anatomischen Verbindung von Arteria und Vena testicularis im Bereich des Samenstranges, im Sinne einer Gegenstromverteilung, Testosteron von der Vena testicularis in die Arteria testicularis übergegangen ist. Ein ähnliches Prinzip der Gegenstromverteilung wird für den

Übergang von Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  aus der Vena uterina in die Arteria ovarica unterstellt (McCracken et al., 1972).

Tabelle 18 gibt eine Gegenüberstellung der in den verschiedenen Gefäßen gemessenen durchschnittlichen Hormonkonzentrationen, Tabelle 19 fasst zusammen, inwieweit der Verlauf der Hormone in den einzelnen Gefäßen korreliert war. Dabei zeigt sich, dass für alle vier erfassten Steroide eine hohe Korrelation zwischen den in der Peripherie und der Arteria testicularis gemessenen Werte bestand; zum Konzentrationsverlauf in der Vena testicularis ergab sich eine positive Korrelation für Estronsulfat, Testosteron und Progesteron, nicht jedoch für Estron. Entsprechend ergab sich für die Konzentrationsverläufe in Arteria und Vena testicularis lediglich für Estronsulfat und Progesteron eine signifikante positive Korrelation. Wie oben bereits dargelegt, können diese geringer ausgeprägten Korrelationen zum Verlauf der Steroidkonzentrationen in der Vena testicularis damit erklärt werden, dass die testikuläre Sekretion diese Wirkstoffe nicht kontinuierlich sondern pulsatil, d.h. diskontinuierlich erfolgt, wie dies bereits von Walters et al. (1984) durch Messungen in der Vena cava caudalis für die ovarielle Steroidsekretion beim Rind gezeigt werden konnte.

Hinsichtlich der absoluten Konzentration ergibt sich, dass die im peripheren Kreislauf der Eber gemessenen Werte für Estron, Estronsulfat und Testosteron mit den bisher in der Literatur gemachten Angaben übereinstimmen (Claus und Hoffmann, 1980; Ford, 1983a,b; Schopper et al., 1984; Wichmann et al., 1984), unbeschadet einer gewissen Schwankungsbreite, die in Abhängigkeit von der angewandten Methodik zu sehen ist. Bei allen Alterstufen ergaben sich für Estronsulfat die höchsten Konzentrationen, die von Testosteron lagen stets um ca. 50% niedriger.

Die in der Hodenvene gemessenen Werte für Estron bestätigen die von Claus und Hoffmann (1980) als freies Gesamtöstrogen ermittelten Daten, deutlich höher als dort beschrieben liegen jedoch die in den vorliegenden Untersuchungen erhaltenen Werte für Estronsulfat und Testosteron. Sie liegen damit in dem von Setchell et al. (1983) beschriebenen Konzentrationsbereich. Anders als im peripheren Kreislauf ist bei den untersuchten Ebern bis zum Alter von ca. 1 Jahr in der Vena testicularis Testosteron das vorherrschende Steroid, erst danach erreicht Estronsulfat höhere Konzentrationen.

Für die gemessenen Hormone konnten in der Literatur keine Angaben über deren Konzentrationen in der Arteria testicularis gefunden werden; ein Vergleich ist daher nicht möglich.

Mittels Anwendung des HPLC-gekoppelten RIA konnte in vorliegenden Untersuchungen auch der sichere, qualitative Beweis angetreten werden, dass E2 $\beta$  ein Produkt der testikulären Steroidhormonproduktion ist und entsprechend den pharmakokinetischen Gegebenheiten auch im Seminalplasma vorkommt.

Die für das Seminalplasma geschlechtsreifer Alteber erhobenen Daten bezüglich des Gehaltes an Estron, Estronsulfat und Testosteron decken sich mit denen zahlreicher Veröffentlichungen, vor allem aber im Hinblick auf hohe individuelle Schwankungen. Auch die Reihenfolge ist identisch mit den höchsten Konzentrationen bei Estronsulfat, gefolgt von Testosteron und Estron; Angaben zu Progesteron liegen nicht vor (Claus et al., 1983; 1985; Schopper et al.; 1984). Bei Vergleich mit den Blutwerten der geschlechtsreifen Eber (>365 Tage) zeigt sich, dass die im Seminalplasma gemessenen mittleren Konzentrationen von Estronsulfat, Testosteron und Progesteron die mittleren Konzentrationen, wie sie für die periphere Zirkulation und die Arteria testicularis gemessen wurden, deutlich unterschreiten. Dieser Befund kann dahingehend interpretiert werden, dass keine aktive Sekretion von Steroiden in das Seminalplasma erfolgt. Offensichtlich können die in den Leydig-Zellen produzierten Sexualhormone die Blut-Hoden-Schranke nicht oder nur in sehr geringem Umfang überwinden. Ihr Vorkommen im Seminalplasma muss demnach mit den ihrer Verteilung im Organismus zugrunde liegenden pharmakokinetischen Gegebenheiten erklärt werden. Diese Befunde und die dazu gegebene Interpretation schließen zwar nicht aus, dass den im Seminalplasma vorkommenden Östrogenen eine Bedeutung im weiblichen Genitale im Zusammenhang mit dem Spermientransport und der Befruchtung zukommt, wie dies von Claus et al. (1987) postuliert wurde, die eigenen Beobachtungen lassen dies jedoch eher unwahrscheinlich erscheinen, da aufgrund der durchgeführten Untersuchungen kein aktives Regulationsprinzip erkannt werden kann.

### **5.2.2 Östrogensulfotransferase (OST) und Arylsulfatase C (ASC)**

Die Untersuchungen auf das Vorkommen von Östrogensulfotransferase im Hoden und Nebenhoden wurden einmal ohne und einmal mit Zusatz des Cofaktors PAPS durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die im Nebenhodenhomogenat bereits ohne PAPS-Zusatz messbare Östrogensulfotransferase-Aktivität (s. Tabelle 28) durch Zusatz von PAPS deutlich gesteigert werden konnte, ein Reaktionsgleichgewicht war nach annähernd 15 Minuten erreicht. Im

Gegensatz dazu konnte mit Hodenhomogenat auch nach Zusatz von PAPS keine Aktivität der Östrogensulfotransferase nachgewiesen werden. Obwohl Hobkirk et al. (1989) im Cytosol aus einer hochaufgereinigten Leydig-Zell-Kultur aus Schweinehoden eine Östrogensulfotransferase-Aktivität nachweisen konnte, lassen die vorliegenden Befunde eher darauf schließen, dass die hohen in der Vena testicularis gemessenen Estronsulfatkonzentrationen nicht testikulären Ursprungs sind. Nach Wilkens und Münster (1987) erfolgt die Versorgung von Hoden und Nebenhoden über die gleichen Blutgefäße, die von den beiden Organen kommenden Blut- und Lymphgefäße münden letztendlich alle wieder in die Vena testicularis ein (Vollmerhaus, 1987). Es ist daher eher darauf zu schließen, dass die in der Vena testicularis gemessenen Estronsulfatkonzentrationen aus einer Sulfatierung von Estron im Nebenhoden resultieren. Diese Vermutung ist in Übereinstimmung mit einer Beobachtung von Claus et al. (1983, 1985), die in der Rete testis-Flüssigkeit praktisch nur freie Östrogene nachweisen konnten. Dieser Befund weist auf eine differenzierte Beteiligung von Hoden und Nebenhoden am Östrogenmetabolismus hin. In zahlreichen Untersuchungen konnte zwischenzeitlich die Bedeutung von Östrogenen für die Funktionalität des Nebenhodens und die dort erfolgende Rückresorption der Rete testis-Flüssigkeit gezeigt werden (Connell und Donjacour, 1985; Hess et al., 1997, Dhar et al., 1998). Möglicherweise muss in der im Nebenhoden stattfindenden Sulfatierung von Estron ein Regulativ hinsichtlich der Verfügbarkeit von freiem, eine Rezeptorbindung eingehenden Estron gesehen werden.

Die Befunde zur Arylsulfatase-Aktivität sind insofern schwer interpretierbar, da in den durchgeführten Untersuchungen neben der enzymatischen Hydrolyse offensichtlich auch eine chemische Substratspaltung stattfand. Der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse war aber dennoch gut darstellbar, in beiden Organen, Hoden und Nebenhoden, konnte durch Hydrolyse von  $^3\text{H}$ -Estronsulfat in freies  $^3\text{H}$ -Estron eine Arylsulfatase-Aktivität eindeutig nachgewiesen werden, wobei die Aktivität im Hoden höher ausgeprägt zu sein scheint als im Nebenhoden. Dies allerdings könnte auch auf unterschiedlichen Proteingehalten der Gewebepreparationen beruhen. Die hohe Arylsulfatase-Aktivität kann erklären, warum Claus et al. (1983, 1985) in der Rete testis-Flüssigkeit praktisch nur freies Estron nachweisen konnten und eine möglicherweise in den Leydig-Zellen vorhandene Östrogensulfotransferase-Aktivität (Hobkirk et al., 1989) in vorliegenden Untersuchungen nicht nachweisbar war.



Die gleichermaßen hohe Östrogensulfotransferase- und Arylsulfatase-Aktivität im Nebenhoden lässt darauf schließen, dass - wie oben bereits ausgeführt - im Nebenhoden die Verfügbarkeit von freiem, biologisch aktivem Estron durch beide Enzyme reguliert wird. Damit ergibt sich die weitere Frage nach einer möglichen zellulären Kompartimentierung dieser beiden Enzyme in Nebenhoden und Hoden; zur Beantwortung dieser Frage sind weitere Untersuchungen mittels Immunhistochemie oder in situ-Hybridisierung notwendig.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

36 geschlechtsgesunde Eber verschiedener Rassen wurden im Alter zwischen 98 und 995 Lebenstagen kastriert. In unterschiedlicher Häufigkeit konnten unter der Operation von jeweils einem Tier Blutproben aus der Arteria und Vena testicularis sowie der Vena auricularis magna bzw. der Vena cava cranialis (periphere Zirkulation) gewonnen werden, von 6 geschlechtsreifen Ebern wurden die Hoden mit Nebenhoden unmittelbar nach dem Absetzen zur weiteren Aufbereitung ins Labor verbracht. Weiterhin stand Seminalplasma von 20 Deckebern zur Verfügung.

Zur näheren Charakterisierung der testikulären Steroidsekretion wurden in allen Blutproben mittels Radioimmuntest Estron (E1), Estronsulfat (E1S), Testosteron (T) und Progesteron (P4) bestimmt. Für alle vier Wirkstoffe ergaben sich in der testikulären Zirkulation deutlich positive arteriovenöse Differenzen; damit wurde erstmals P4 als Produkt der testikulären Steroidproduktion erkannt. Für E1, E1S und P4 ergaben sich keine Konzentrationsunterschiede zwischen der peripheren Zirkulation und der A. testicularis; die Werte für Testosteron waren dagegen der Tendenz nach in der A. testicularis höher, was auf eine Gegenstromverteilung aufgrund der engen anatomischen Verflechtung von A. und V. testicularis hinweist. Bis zum Alter von ca. 1 Jahr dominiert die Sekretion von T, danach die von E1S. Eine altersabhängige Zunahme der testikulären Steroidhormonsekretion war nur für E1 und E1S ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ) erkennbar und auch nur in der peripheren Zirkulation. Als Erklärung hierfür werden die in der V. testicularis stark schwankenden und auf eine pulsatile Freisetzung hindeutenden Werte interpretiert, bei einer gleichzeitigen „Windkesselfunktion“ des allgemeinen Kreislaufes. Unbeschadet davon war der Verlauf der Hormonwerte in der peripheren Zirkulation mit denen der testikulären Zirkulation (A. und V. testicularis) in hohem Maße korreliert; entsprechend zeigte sich eine hohe Korrelation für den Verlauf der Östrogen- und T- Werte in der V. testicularis, keine Korrelation ergab sich zur Sekretion von P4.

Die im Seminalplasma gemessenen Werte unterschreiten noch die in der peripheren Zirkulation gemessenen und lassen einen aktiven Übergang der gemessenen Steroide in das Seminalplasma eher unwahrscheinlich erscheinen.

Die bei der Kastration entnommenen Hoden und Nebenhoden wurden getrennt zu Gewebekomogenaten verarbeitet und unter Zugabe  $^3\text{H}$ -markiertem E1 bzw. E1S auf das Vorhandensein von Östrogensulfotransferase- (OST-) bzw. Arylsulfatase C-(ASC-) untersucht. Eine OST-Aktivität konnte praktisch ausschließlich im Nebenhodenhomogenat

festgestellt werden, ihre Darstellbarkeit war an die Zugabe des spezifischen Cofaktors PAPS (3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat) gebunden. ASC-Aktivität war in beiden Geweben vorhanden, mit einer offensichtlich höheren Aktivität im Hoden.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die in der V. testicularis gemessenen hohen E1S-Konzentrationen eher epididymalen Ursprungs sind als testikulären; das Vorhandensein der OST und ASC im Nebenhoden wie auch von ASC im Hoden läßt den Schluß zu, dass über beide Enzyme die lokale Verfügbarkeit des biologisch aktiven E1 reguliert wird.

## 7 SUMMARY

36 healthy boars of different breeds aged between 98 and 995 days were castrated. During surgery and with varying success from each animal blood samples could be collected from the testicular artery and vein as well as from the Vena auricularis and Vena cava cranialis (peripheral circulation). From 6 boars and immediately after surgery testes with the connecting epididymes were brought to the laboratory for further processing. In addition, seminal plasma was available from 20 A.I.-boars.

To further characterize testicular steroid secretion estrone (E1), estrone sulphate (E1S), testosterone (T) and progesterone (P4) were determined by radioimmunoassay in all blood plasma samples obtained. All four hormones exhibited distinctly positive arteriovenous differences in testicular circulation; thus for the first time P4 was identified as a secretory product of testicular origin. Concentrations of E1, E1S and P4 were not different between peripheral circulation and in the testicular artery; there was a tendency for higher values for T in the testicular artery which might result from a countercurrent distribution phenomenon due to the immediate anatomical connections of testicular vein and artery. Up to one year T was the major steroid, after this it was E1S. An age-dependent increase of testicular steroid synthesis was only observed for E1 ( $p < 0,01$ ) and E1S ( $p < 0,001$ ) and only in peripheral circulation. This was interpreted as a result of a pulsatile testicular steroid secretion as was indicated by the high variability of values obtained and the function of the general circulation as sort of an „air chamber“. Hormone concentrations in peripheral circulation were highly correlated with values in testicular circulation (A. and V. testicularis), likewise estrogen and T concentrations in testicular vein were correlated, while no such correlation could be established for P4.

Steroid concentrations determined in seminal plasma were lower than those in peripheral circulation which does not indicate that they are actively secreted into the male genital tract. When supplied to the laboratory, testis and epididymis were separated and homogenized. By using  $^3\text{H}$ -E1 and  $^3\text{H}$ -E1S as substrates, the activities of estrogen sulfotransferase (OST) and arylsulfatase C (ASC) were tested. Activity of OST was largely restricted to the epididymis and could only be demonstrated after addition of the specific co-factor PAPS (3'phosphoadenosine-5'phosphosulphate). ASC-activity was demonstrated in both tissues with an apparently higher activity in the testis.

These results indicate that the high concentrations of E1S determined in testicular vein most likely origin in the epididymis, in addition the presence of OST and ASC in the epididymis and of ASC in the testis indicates that both enzymes regulate the local availability of biologically active E1.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

### **Aafjes J.H., Vreeburg J.T. (1972)**

Distribution of 5-dihydrotestosterone in the epididymis of bull and boar, and its concentration in rat epididymis after ligation of efferent testicular ducts, castration and unilateral gonadectomy.

Journal of Endocrinology 53, 85-93

### **Allag I.S., Das R.P., Roy S. (1983)**

The binding patterns of antisera to sex steroids and human gonadotropins of human and rhesus monkey spermatozoa.

Journal of Andrology 4, 415-420

### **Baird D.T., Galbraith A., Fraser I.S., Newsam J.E. (1973)**

The concentration of oestrone and oestradiol-17 $\beta$  in spermatic venous blood in man.

Journal of Endocrinology 57, 285-288

### **Baird D.T. (1977)**

Evidence in vivo for the two-cell hypothesis of estrogen synthesis by the sheep Graafian follicle.

Journal of Reproduction and Fertility 50, 183-185

### **Bedford J.M., Yanagimachi R. (1991)**

Epididymal storage at abdominal temperature reduces the time required for capacitation of hamster spermatozoa.

Journal of Reproduction and Fertility 91, 403-410

### **Bedrak E., Samuels L.T. (1969)**

Steroid biosynthesis by the equine testis.

Endocrinology 85, 1186-1195

**Benahmed M., Reventos J., Tabone E., Saez J.M. (1985)**

Cultured Sertoli cell-mediated FSH stimulatory effect on Leydig cell steroidogenesis.

American Journal of Physiology 248, 176-181

**Booth W.D. (1983a)**

Development of some male characteristics supported by oestrone but not dehydroepiandrosterone in the boar.

Journal of Reproduction and Fertility 68, 9-16

**Booth W.D. (1983b)**

In-vitro metabolism of unconjugated androgens, oestrogens and the sulphate conjugates of androgens and oestrone by accessory sex organs of the mature domestic boar.

Journal of Endocrinology 96, 457-464

**Bouthillier M., Bleau G., Chapdelaine A., Roberts K.D. (1984)**

Distribution of steroid sulfotransferase in the male hamster reproductive tract.

Biology of Reproduction 31, 936-941

**Brodie A., Inkster S. (1993)**

Aromatase in human testis.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 44, 549-555

**Brooks S.C., Battelli M.G., Corombos J.D. (1987)**

Endocrine steroid sulfotransferases: porcine endometrial estrogen sulfotransferases.

Journal of Steroid Biochemistry 26, 285-290

**Burstein S., Dorfman R.I. (1963)**

Determination of mammalian steroid sulfatase with  $7\alpha\text{-H}^3$   $\beta$ -hydroxyandrost-5-en-17-one sulfate.

Journal of Biological Chemistry 238, 1656-1660

**Carnegie J.A., Robertson H.A. (1978)**

Conjugated and unconjugated estrogens in fetal and maternal fluids of the pregnant ewe: a possible role for estrone sulfate during early pregnancy.  
Biology of Reproduction 19, 202-211

**Chang P.L., Varey P.A., Rosa N.E., Ameen M., Davidson R.G. (1986)**

Association of steroid sulfatase with one of the arylsulfatase-C isozymes in human fibroblasts.  
Journal of Steroid Biochemistry 261, 14443-14447

**Chang P.L., Mueller O.T., Lafrenie R.M., Varey P.A., Rosa N.E., Davidson R.G., Henry W.M., Shows T.B. (1990)**

The human arylsulfatase-C isozymes: two distinct genes that escape from X inactivation.  
American Journal of Human Genetics 46, 729-737

**Cheng C.Y., Rose R.J., Boettcher B. (1981)**

The binding of oestradiol-17 $\beta$  to human spermatozoa – an electron microscope autoradiographic study.  
International Journal of Andrology 4, 304-313

**Clarke C.L., Adams J.B., Wren B.G. (1982)**

Induction of estrogen sulfotransferase in the human endometrium by progesterone in organ culture.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 55, 70-75

**Claus R., Hoffmann B. (1980)**

Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in bloodplasma of boars.  
Acta Endocrinologica 94, 404-411



**Claus R., Hoffmann B., Karg H. (1971)**

Determination of 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one, a boar taint steroid in pigs, with reference to relationship to testosterone.

Journal of Animal Science 33, 1293-1297

**Claus R. Schopper D., Wagner H.-G. (1983)**

Seasonal effects on steroids in blood plasma and seminal plasma of boars.

Journal of Steroid Biochemistry 19, 725-729

**Claus R., Schopper D., Hoang-Vu C. (1985)**

Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar.

Acta Endocrinologica 109, 281-288

**Claus R., Hoang-Vu C., Schopper D., Weiler U. (1987)**

Seasonal variation of the ovarian function in unmated sows revealed by the measurement of progesterone and 17 $\beta$ -oestradiol in peripheral bloodplasma.

Journal of Veterinary Medicine A 34, 344-352

**Conley A.J., Corbin C.J., Hinshelwood M.M., Liu Z., Simpson E.R., Ford J.J., Harada N (1996)**

Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis.

Biology of Reproduction 54, 497-505

**Conley A.J., Corbin J., Smith T., Hinshelwood M., Liu Z., Simpson E.R. (1997)**

Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene?

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 61, 407-413

**Connell C.J., Donjacour A. (1985)**

A morphological study of the epididymides of control and estradiol-treated prepubertal dogs.

Biology of Reproduction 33, 951-969

**Cooke G.M., Ferguson S.E., Rytina E., Gower D.B. (1983)**

Properties of porcine liver and testicular steroid sulphotransferases: reaction conditions and influence of naturally occurring steroids and steroid sulphates.  
Journal of Steroid Biochemistry 19, 1103-1109

**D'Occhio M.J., Brooks D.E. (1980)**

Effects of androgenic and oestrogenic hormones on mating behaviour in rams castrated before and after puberty.  
Journal of Endocrinology 86, 403-411

**Dhar J.D., Mishra R., Setty B.S. (1998)**

Estrogen, androgen and antiestrogen responses in the accessory organs of male rats during different phases of life.  
Endocrine Research 24, 159-169

**Dibbelt L., Kuss E. (1984)**

Human placental steroid sulfatase solubilized with a cholic acid dervate: molecular mass, kinetic properties and susceptibility to glykosidases.  
Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physikalische Chemie 365, 1145-1153

**Diczfalusy E. (1964)**

Endocrine functions of the human fetoplacental unit.  
Federated Proceedings 23, 45-58

**Diczfalusy, E. (1969)**

Steroid metabolism in the human fetoplacental unit.  
Acta Endocrinologica 61, 649-664

**Dodgson K.S., Spencer B. (1957)**

Studies on sulphatases. 15. The arylsulphatases of human serum and urine.  
Biochemical Journal 65, 668-673

**Dorrington J.H., Armstrong D.T. (1975)**

Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17 $\beta$  synthesis in cultured Sertoli cells.

Proceedings of the National Academy of Science 72, 2677-2681

**Dorst J. (1991)**

6. Morphologie des Geschlechtssystems

in: "Künstliche Besamung bei Nutztieren."

Busch W., Löhle K., Peter W. (Eds.)

Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, p197

**Dudkiewicz A.B. (1984)**

Purification of boar acrosomal arylsulfatase A and possible role in the penetration of cumulus cells.

Biology of Reproduction 30, 1005-1014

**Eiler H., Graves C.N. (1977)**

Oestrogen content of semen and the effect of exogenous oestradiol-17 $\beta$  on the oestrogen and androgen concentration in semen and blood plasma of bulls.

Journal of Reproduction and Fertility 50, 17-21

**Evans H.E., Sack W.O. (1973)**

Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth, external features and selected references.

Anatomical and Histological Embryology 2, 11-45

**Falter K. (1999)**

In vitro-Untersuchungen zur Bildung und Metabolisierung konjugierter Östrogene in der Rinderplazenta während der Gravidität und unter der Geburt.

Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Farooqui A.A., Bachhawat B.K. (1972)**

Purification and properties of arylsulphatase A from chicken brain.

Biochemical Journal 126, 1025-1033

**Farooqui A.A. (1987)**

Clinical and metabolic aspects of sulfohydrolase.

Advances in Clinical Chemistry 26, 157-201

**Fawcett D.W., Neaves W.B., Flores M.N. (1973)**

Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis.

Biology of Reproduction 9, 500-532

**Fawcett D.W. (1975)**

Ultrastructure and function of the Sertoli cell.

In: „Handbook of Physiology.“

Hamilton D.W. and Greep R.O. (Eds.)

American Physiology Society, Washington, pp21-55

**Fluharty A.L., Stevens R.L., Fung D., Peak S., Kihara H. (1975)**

Uridine diphospho-N-acetyl-galactosamine-4-sulfate sulfohydrolase activity of human arylsulfatase B and its deficiency in the Maroteaux-Lamy syndrome.

Biochemical and Biophysical Research Communications 64, 955-962

**Ford J.J. (1983a)**

Serum estrogen concentrations during postnatal development in male pigs.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 174, 160-164

**Ford J.J. (1983b)**

Postnatal differentiation of sexual preference in male pigs.

Hormones and Behaviour 17, 152-162

**Ford J.J., Christenson R.K., Maurer R.R. (1980)**

Serum testosterone concentrations in embryonic and fetal pigs during sexual differentiation.

Biology of Reproduction 23, 583-587

**Gadella B.M., Colenbrander B., Lopez-Cardozo M. (1991)**

Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals.

Biology of Reproduction 45, 381-386

**Gadella B.M., Colenbrander B., van Golde L.M.G., Lopes-Cardozo M. (1992)**

Characterization of three arylsulfatases in semen: seminolipid sulfohydrolase activity is present in seminal plasma.

Biochimica et Biophysica Acta 1128, 155-162

**Ganjam V.K., Amann R.P. (1976)**

Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions.

Endocrinology 99, 1618-1630

**Gasparini F. J., Hochberg R. B., Lieberman S. (1976)**

Biosynthesis of steroid sulfates by the boar testes.

Biochemistry 15, 3969-3975

**Geisert R.D., Zavy M.T., Moffatt R.J., Blair R.M., Yellin T. (1990)**

Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs.

Journal of Reproduction and Fertility Suppl. 40, 293-305

**Gentz F. (1994)**

Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Gravidität der Stute.

Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin, Giessen

**Glover D.T., Nicander L. (1971)**

Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis.  
Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 13, 39-50

**Gregory J.D., Robbins P.W. (1960)**

Metabolism of sulfur compounds (sulfate metabolism).  
Annual Reviews of Biochemistry 29, 347-364

**Griswold M.D., Morales C., Sylvester S.R. (1988)**

Molecular biology of the Sertoli cell.  
Oxford Reviews of Reproductive Biology 10, 124-161

**Grodin J.M., Siiteri P.K., MacDonald P.C. (1973)**

Source of estrogen production in the postmenopausal women.  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 36, 207

**Hall P.F. (1988)**

Testicular steroid synthesis: Organization and regulation.  
In: „The Physiology of Reproduction.“  
Knobil, E. and Neill, J. (Eds.)  
Raven Press Ltd., New York, pp 975-997

**Hamilton D.W. (1973)**

The epididymis as a possible site for control of fertility in the male.  
Advances in the Biosciences 10, 127-144

**Hartl P. (1990)**

Pulsatile Freisetzung von Sexualhormonen und Gonadotropinen bei  
Besamungsbullen.  
Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

**Hauer J. (1933)**

Zur Trächtigkeitsdiagnose beim Schwein durch den Nachweis des Ovarialhormons im Harn.

Wiener Tierärztliche Monatsschrift 20, 699-700

**Hermo L., Lalli M. (1978)**

Monocytes and mast cells in the limiting membrane of human seminiferous tubules.

Biology of Reproduction 19, 92-100

**Hess R.A., Bunick D., Lee K.-H., Bahr J., Taylor J.A., Korach K.S., Lubahn D.B. (1997)**

A role for oestrogens in the male reproductive system.

Nature 390, 509-512

**Hinton B.T., Palladino M.A. (1995)**

Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment.

Microscopy Research and Technique 30, 67-81

**Hobkirk R. (1985)**

Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological roles.

Canadian Journal of Biochemistry and Cellular Biology 63, 1127-1144

**Hobkirk R., Cardy C., Nilsen M., Saidi F. (1982)**

Estrone sulfatase activity in guinea pig tissue.

Journal of Steroid Biochemistry 17, 71-76

**Hobkirk R., Renaud R., Raeside J.I. (1989)**

Partial characterization of steroid sulfohydrolase and sulfotransferase activities in purified porcine Leydig cells.

Journal of Steroid Biochemistry 32, 387-392

**Höveler R. (1991)**

Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Ovarfunktion bei der graviden und ingraviden Hündin.

Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin, Giessen

**Hoffmann B. (1977)**

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind. Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten.

Fortschritte der Veterinärmedizin 26, Beiblatt zum Zentralblatt der Veterinärmedizin, Verlag Paul Parey

**Hoffmann B., Landeck A. (1999)**

Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion.

Animal Reproduction Science 57, 89-98

**Hoffmann B., Kyrein H.J., Ender M.L. (1973)**

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.

Hormone Research 4, 302-310

**Hoffmann B., Wagner W.C., Gimenez T. (1976)**

Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term.

Biology of Reproduction 15, 126-133

**Hoffman, B., Wagner W.C., Hixon J.E., Bahr J. (1979)**

Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow.

Animal Reproduction Science 2, 253-266

**Hoffmann B., Höveler R., Hasan S.H., Failing K. (1992)**

Ovarian and pituitary function in dogs after Hysterectomy.

Journal of Reproduction and Fertility 96, 873-845



**Hoffmann B., Goes de Pinho T., Schuler G. (1997)**

Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy.

Experimental Clinical Endocrinology and Diabetes 105, 296-303

**Hoffmann B., Falter K., Vielemeier A., Failing K., Schuler G. (2001)**

Investigations on the activity of bovine placental oestrogen sulfotransferase and –sulfatase from midgestation to parturition.

Experimental Clinical Endocrinology and Diabetes 109, 294-301

**Holcenberg J.S., Rosen S.W. (1965)**

Enzymatic sulfation of steroids by bovine tissues.

Archives of Biochemistry and Biophysics 110, 551-557

**Hutchinson J.B. (1991)**

Hormonal control of behaviour: steroid action in the brain.

Current Opinions in Neurobiology 1, 562-570

**Inkster S.E., Brodie A.M.H. (1989)**

Immunocytochemical studies of aromatase in early full-term human placental tissues: comparison with biochemical assays.

Biology of Reproduction 41, 889-898

**Inkster S.E., Yue W., Brodie A. (1995)**

Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80, 1941-1947

**Inoué J., Cerbito W.A., Oguri N., Matsuzawa T., Sato K. (1993)**

Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions.

International Journal of Andrology 16, 155-158

**Iwamori M., Moser H.W., Kishimoto Y. (1976)**

Solubilization and partial purification of steroid sulfatase from rat liver: characterization of estrone sulfatase.

Archives of Biochemistry and Biophysics 174, 199-208

**Janulis L., Bahr J.M., Hess R.A., Bunick D. (1996)**

P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification.

Journal of Andrology 17, 651-658

**Janulis L., Bahr J.M., Hess R.A., Janssen S., Osawa Y., Bunick D. (1998)**

Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase.

Journal of Andrology 19, 65-71

**Jones R. (1998)**

Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis.

Journal of Reproduction and Fertility Supplement 53, 73-84

**Joshi H.S., Raeside J.I. (1973)**

Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar.

Journal of Reproduction and Fertility 33, 411-423

**Juniewicz P.E., Johnson B.H. (1980)**

Episodic fluctuation of total estrogens in peripheral blood of bulls: effects of estradiol-17 $\beta$  on LH and testosterone secretion.

Biology of Reproduction 23, 1029-1037

**Kawano A., Payne A.H., Jaffe R.B. (1973)**

Gonadal steroid sulfates and sulfatase. VI. Comparative metabolism in isolated seminiferous tubules and minces of human testis.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 37, 441-447

**Kelch R.P., Jenner M.R., Weinstein R., Kaplan S.L., Grumbach M.M. (1972)**

Estradiol and testosterone secretion by human, simian, and canine testes, in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome.

The Journal of Clinical Investigation 51, 824-830

**Kerr J.B., Sharpe R.M. (1985)**

Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation.

Endocrinology 116, 2592-2604

**Kohler C. (2004)**

Altersabhängige Expression und Lokalisation des Progesteron- und Östrogenrezeptors  $\alpha$  im Eberhoden.

Inaugural-Dissertation des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Küst D. (1934)**

Über Sexualhormone bei den Haustieren.

Klinische Wochenschrift 13, 1782-1784

**Landeck A.G. (1997)**

Untersuchungen zum jahreszeitlichen Vorkommen und der Korrelation testikulärer Sexualhormone beim Hengst in Blut und Seminalplasma, deren Verteilung im Ejakulat und Beziehungen zur Ejakulatqualität.

Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin, Gießen

**Leblond C.P., Clermont Y. (1952)**

Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat.

Annals of the New York Academy of Science 55, 548-573

**Lemazurier E., Seralini G.E. (2002)**

Evidence for sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activities in equine epididymis and uterus.  
Theriogenology 58, 113-121

**Liebich H.-G. (1990)**

XIII. Männliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculina).  
in: „Funktionelle Histologie.“  
Schattauer Verlagsgesellschaft Stuttgart, pp 245-247

**Lukesch C. (1992)**

Untersuchungen zum 24-Stundenprofil von Androstendion, Testosteron, 5- $\alpha$ -Dihydrotestosteron sowie von Estradiol-17 $\beta$  und Cortisol im peripheren Plasma des Rüden.  
Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Luu-Thé V., Bernier F., Dufort I. (1996a)**

Steroid sulfotransferases.  
Journal of Endocrinology 150, Suppl., 87-97

**Luu-Thé V., Bernier F., Dufort I., Labrie F. (1996b)**

Molecular biology of steroid sulfotransferases.  
Annals of the New York Academy of Sciences 784, 137-148

**Mason J.I., France J.T., Magness R.R., Murry B.A., Rosenfeld C.R. (1989)**

Ovine placental steroid 17 $\beta$ -hydroxylase/C-17,20-lase, aromatase and sulphatase in dexamethasone-induced and natural parturition.  
Journal of Endocrinology 122, 351-359

**Mather J.P., Saez J.M., Haour F. (1982)**

Regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in cultured porcine Leydig cells.  
Endocrinology 110, 933-940

**Mattioli M., Gaiani R., Bono G., Chiesa F. (1984)**

Estrone to estrone sulfate conversion and viceversa in bovine placentome.  
Archivio Veterinario Italiano 35, 22-26

**McCracken J.A., Carlson J.C., Glew M.E., Goding J.R., Baird D.T., Green K., Samuelsson B. (1972)**

Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  identified as a luteolytic hormone in sheep.  
Nature New Biology 238, 129-134

**Mehl E., Jatzkewitz H. (1968)**

Cerebroside 3-sulfate as a physiological substrate of arylsulfatase A.  
Biochimica et Biophysica Acta 151, 619-627

**Moon Y.S., Hardy M.H. (1973a)**

The early differentiation of the testis and interstitial cells in the fetal pig, and its duplication in organ culture.  
American Journal of Anatomy 138, 253-267

**Moon Y.S., Hardy M.H., Raeside J.I. (1973b)**

Biological evidence for androgen secretion by the early fetal pig testes in organ culture.  
Biology of Reproduction 9, 330-337

**Nicander L., Osman D.I., Ploen L., Bugge H.P., Kvisgaard K.N. (1983)**

Early effects of efferent ductule ligation on the proximal segment of the rat epididymis.  
International Journal of Andrology 6, 91-102

**Nitta H., Bunick D., Hess R.A., Janulis L., Newton S.C., Millette C.F., Osawa Y., Shizuta Y., Toda K., Bahr J.M. (1993)**

Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase.

Endocrinology 132, 1396-1401

**Noël H., Plante L., Bleau G., Chapdelaine A., Roberts K.D. (1983)**

Human placental steroid sulfatase: purification and properties.

Journal of Steroid Biochemistry 19, 1591-1598

**Öz K.O., Millsaps R., Welch R., Birch J., Zerwekh J.E. (2001)**

Expression of aromatase in the human growth plate.

Journal of Molecular Endocrinology 27, 249-253

**Papadopoulos V., Drosowsky M.A., Carreau S. (1987)**

On the existence of two Leydig cell populations in aged human testis.

Annals of the New York Academy of Science 513, 356-358

**Pashen R.L., Allen W.R. (1979)**

Endocrine changes after foetal gonadectomy and changes during normal and induced parturition in the mare.

Animal Reproduction Science 2, 271-288

**Payne A.H., Kelch R.P., Musich S.S., Halpern M.E. (1976)**

Intratesticular site of aromatization in the human.

Journal of Endocrinology and Metabolism 42, 1081-1087

**Payne A.H., Youngblood G.L. (1995)**

Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells.

Biology of Reproduction 52, 217-225

**Payne A.H., Kelch R.P. (1975)**

Comparison of steroid metabolism in testicular compartments of human and rat testes.

Current Topics in Molecular Endocrinology 2, 97-108

**Payne A.H., O'Shaughnessy P.J. (1996)**

in: „The Leydig Cell.“

Payne A.H., Hardy M.P., Russell L.D. (Eds.)

Chapter 12, pp 259-286

Cache River Press, 1<sup>st</sup> Edition

**Pelliniemi L.J. (1975)**

Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos.

American Journal of Anatomy 144, 89-112

**Pelliniemi L.J. (1976)**

Ultrastructure of the indifferent gonad in male and female pig embryos.

Tissue and Cell 8, 163-174

**Perry J.S., Heap R.B., Amoroso E.C. (1973)**

Steroid hormone production by pig blastocysts.

Nature 245, 45-47

**Pinho T. (1995)**

Untersuchungen zum Verlauf freier und konjugierter Östrogene in Blutplasma, Kot und Urin während der Trächtigkeit des Rindes.

Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Pomerantz D.K. (1979)**

Effects of in vivo gonadotropin treatment on estrogen levels in the testis of the immature rat.

Biology of Reproduction 21, 1247-1255

**Raeside J.I. (1969)**

The isolation of estrone sulfate and estradiol-17 $\beta$  sulfate from stallion testes.  
Canadian Journal of Biochemistry 47, 811-815

**Raeside J.I. (1979)**

Seasonal changes in the concentration of estrogens and testosterone in the plasma of the stallion.  
Animal Reproduction Science 1, 205-212

**Raeside J.I. (1982)**

The formation of unconjugated and sulfoconjugated estrogens by Leydig cells of the boar testis.  
Canadian Journal of Biochemistry and Cellular Biology 61, 790-795

**Raeside J.I., Sigman D.M. (1975)**

Testosterone levels in early fetal testes of domestic pigs.  
Biology of Reproduction 13, 318-321

**Raeside J.I., Renaud R.L. (1983)**

Estrogen and androgen production by purified Leydig cells of mature boars.  
Biology of Reproduction 28, 727-733

**Raeside J.I., Lobb D.K. (1984)**

Metabolism of androstenedione by Sertoli cell enriched preparations and purified Leydig cells from boar testes in relation to estrogen formation.  
Journal of Steroid Biochemistry 20, 1267-1272

**Raeside J.I., Christie H.L. (1997)**

Estrogen concentrations in semen of the stallion.  
Animal Reproduction Science 48, 293-300



**Raeside J.I., Renaud R.L., Friendship R.M. (1989)**

Aromatization of 19-norandrogens by porcine Leydig cells.  
Journal of Steroid Biochemistry 32, 729-735

**Raeside J.I., Wilkinson C.R., Farkas G. (1993)**

Ontogenesis of estrogen secretion by porcine fetal testes.  
Acta Endocrinologica 128, 549-554

**Raeside J.I., Christie H.L., Renaud R.L. (1999)**

Androgen and estrogen metabolism in the reproductive tract and accessory sex glands of the domestic boar (*sus scrofa*).  
Biology of Reproduction 61, 1242-1248

**Riesenbeck A., Kohler C., Rostalski A., Hoffmann B. (2001)**

Age-dependent expression of oestrogen and progesterone receptors in the testis and epididymis of the boar in relation to the testicular hormone secretion.  
34. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 95

**Riesenbeck A., Dengler P., Hoffmann B. (1999)**

Zum Vorkommen physiologischer und pathophysiologischer Östrogenwerte beim Rüden.  
Proceedings der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft,  
Fachgruppe Kleintierkrankheiten, 45. Jahrestagung, Giessen

**Riisfeldt O. (1948)**

Demonstration of substances with oestrogenic effect in human sperm.  
Acta Endocrinologica 1, 212-221

**Robaire B., Ewing L.L., Zirkin B.R., Irby D.C. (1977)**

Steroid delta4-5alpha-reductase and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis.  
Endocrinology 101, 1379-1390

**Roberts K.D., Bandi L., Calvin H.I., Drucker W.D., Lieberman S. (1964)**

Evidence that steroid sulfates serve as biosynthetic intermediates. IV. Conversion of cholesterol sulfate in vivo to urinary C<sub>19</sub> and C<sub>21</sub> steroidal sulfates.  
Biochemistry 3, 1983-1988

**Robertson H.A., King G.J. (1974)**

Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17 $\beta$  and of oestrone sulphate in the pig at implantation, during pregnancy and at parturition.  
Journal of Reproduction and Fertility 40, 133-141

**Robertson K.M., O'Donnell L., Jones M.E.E., Meachem S.J., Boon W.C., Fisher C.R., Graves K.H., McLachlan R.I., Simpson E.R. (1999)**

Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene.  
Proceedings of the National Academy of Science USA 96, 7986-7991

**Roy A.B. (1976)**

Sulphatases, lysosomes, and disease.  
Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 54, 111-135

**Roy A.B., Mantle T.J. (1989)**

The anomalous kinetics of sulfatase A.  
Biochemical Journal 261, 689-697

**Ruoff B.M., Daniel W.L. (1991)**

Comparative biochemistry of mammalian arylsulfatase C and steroid sulfatase.  
Comparative Biochemistry and Physiology 98B, 313-322

**Russell L.D., Tallon-Doran M., Webber J.E., Wong V., Peterson R.N. (1983)**

Three dimensional reconstruction of rat stage V Sertoli cell: III. A study of specific cellular associations.  
American Journal of Anatomy 167, 181-192

**Schanbacher B.D., Ford J.J. (1976)**

Seasonal profiles of plasma LH, testosterone and estradiol in the ram.  
Endocrinology 99, 752-757

**Schneider S. (1992)**

Untersuchungen zur Freisetzung von LH während des Zyklus der Hündin.  
Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Schopper D., Gaus J., Claus R., Bader H. (1984)**

Seasonal changes of steroid concentrations in seminal plasma of a European wild boar.  
Acta Endocrinologica 107, 425-427

**Schuler G. (1998)**

Indirekte Graviditätsdiagnostik bei der Stute – Erfahrungen mit der Bestimmung des Estronsulfatgehaltes im Blutplasma und im Urin.  
Der praktische Tierarzt 79, 43-49

**Schwarzenberger F., Toole G. S., Christie H. I., Raeside J. I. (1993)**

Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs.  
Acta Endocrinologica 128, 173-177

**Seamans M.C., Roser J.F., Linford R.L., Liu I.K.M., Hughes J.P. (1991)**

Gonadotrophin and steroid concentrations in jugular and testicular venous plasma in stallions before and after GnRH injection.  
Journal of Reproduction and Fertility, Suppl. 44, 57-67

**Setchell B.P., Cox J.E. (1982)**

Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood.  
Journal of Reproduction and Fertility, Supplements 32, 123-127

**Setchell B.P., Laurie M.S., Flint A.P.F., Heap R.B. (1983)**

Transport of free and conjugated steroids from the boar testis in lymph, venous blood and rete testis fluid.

Journal of Endocrinology 96, 127-136

**Sheldrick E.L., Ricketts AP., Flint A.P.F. (1980)**

Placental production of progesterone in ovariectomized goats treated with a synthetic progestagen to maintain pregnancy.

Journal of Reproduction and Fertility 60, 339-348

**Shetty G., Krishnamurthy H.N., Bhatnagar A.S., Moudgal N.R. (1998)**

Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*).

Steroids 63, 414-420

**Silberzahn P., Bouhamidi R., Zwain I., Gaillard J.-L., Martin B. (1988)**

Testosterone blood content is regulated by testicular aromatization-conjugation in the stallion.

Steroids 52, 353-355

**Simard J.P., Ameen M., Chang P.L. (1985)**

Biochemical characterization of arylsulfatase-C isozymes in human fibroblasts.

Biochemical and Biophysical Research Communications 128, 1388-1394

**Simmet L. (1974)**

Zur Technik der Samengewinnung und Verpackung beim Schwein.

Tierzüchter (Hannover) 26, 102-104

**Simpson E.R., Merrill J.C., Hollub A.J., Graham-Lorence S., Mendelson C.R. (1989)**

Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells.

Endocrine Reviews 10, 136-148

**Spencer B. (1958)**

Studies on sulphatases. 20. Enzymic cleavage of aryl hydrogen sulphates in the presence of  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ .

Biochemical Journal 69, 155-159

**Spencer B. (1959)**

Studies on sulphatases. 25. The determination of  $\text{BaS}^{16}\text{O}_3^{18}$  by infrared spectroscopy.

Biochemical Journal 73, 442-447

**Steinhauer K. (1983)**

Wirkung eines Aromatasehemmers (ATD) auf die Östrogenkonzentration im Blut- und Samenplasmas des Ebers.

Diplomarbeit aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzüchtung der Universität Hohenheim

**Stewart D.W., Raeside J.I. (1976)**

Testosterone secretion by the early fetal pig testes in organ culture.

Biology of Reproduction 15, 25-28

**Strott C.A. (1996)**

Steroid sulfotransferases.

Endocrine Reviews 17, 670-697

**Syntin P., Dacheux J.-L., Dacheux F. (1999)**

Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis.

Biology of Reproduction 61, 1622-1635

**Tanphaichitr N., Smith J., Kates M. (1990)**

Levels of sulfogalactosylglycerollipid in capacitated motile and immotile mouse spermatozoa.

Biochemical and Cellular Biology 68, 68528-68535

**Teerds K.J., Closset J., Rommerts F.F.G., De Rooij D.G., Stocco D.M., Colenbrander B., Wensing G.J.G., Hennen G. (1989)**

The effects of pure FSH and LH preparations on the number and function of Leydig cells in immature hypophysectomized rats.

Journal of Endocrinology 120, 97-106

**Thompson E.A., Siiteri P.K. (1974)**

The involvement of human placental microsomal cytochrome p-450 in aromatization.

The Journal of Biological Chemistry 249, 5373-5378

**Thompson F.N., Wagner W.C. (1974)**

Plasma progesterone and oestrogens in sheep during late pregnancy: contribution of the maternal adrenal and ovary.

Journal of Reproduction and Fertility 41, 57-66

**Tong M.H., Song W.-C. (2002)**

Estrogen sulfotransferase: discrete and androgen-dependent expression in the male reproductive tract and demonstration of an in vivo function in the mouse epididymis.

Endocrinology 143, 3144-3151

**Toney T.W., Danzo B.J. (1989)**

Androgen and estrogen effects on protein synthesis by the adult rabbit epididymis.

Endocrinology 125, 243-249

**Tseng L., Liu H.C. (1981)**

Stimulation of arylsulfotransferase activity by progestins in human endometrium in vitro.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 53, 418-421

**Turner T.T. (1984)**

Resorption versus secretion in the rat epididymis.

Journal of Reproduction and Fertility 72, 509-514

**van der Eerden B.C.J., van de Ven J., Lowik C.W.G.M., Wit J.M., Karperien M. (2002)**

Sex steroid metabolism in the tibial growth plate of the rat.

Endocrinology 143, 4048-4055

**van der Molen H.J., Brinkmann A.O., de Jong F.H., Rommerts F.F.G. (1981)**

Testicular oestrogens.

Journal of Endocrinology 89, 33-46

**Van Straaten H.W.M., Wensing C.J.G. (1978)**

Leydig cell development in the testis of the pig.

Biology of Reproduction 18, 86-93

**Van Vorstenbosch C.J.A.H.V., Colenbrander B., Wensing C.J.G. (1984)**

Leydig cell development in the pig testis during the late fetal and early postnatal period: an electron microscopic study with attention to the influence of fetal decapitation.

The American Journal of Anatomy 169, 121-136

**Velle W. (1958a)**

Isolation of oestrone and oestradiol-17 beta from the urine of boars.

Acta Endocrinologica 28, 255-261

**Velle W. (1958b)**

Further investigations on urinary oestrogen excretion by the boar.

Acta Endocrinologica 29, 395-400

**Vollmerhaus, B. (1987)**

Organspezifische Lymphkapillaren und Lymphgefäße.

in: „Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.“

Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (Eds.)

Band III, Verlag Paul Parey, 6. Auflage, p 316

**Walters D.L., Schams D., Schallenberger E. (1984)**

Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow.

Journal of Reproduction and Fertility 71, 479-491

**Weiler S. (1986)**

Verfahren zur Bestimmung von Stilbenrückständen – speziell Diäthylstilböstrol und Dienöstrol – beim Schwein und deren Anwendung unter praktischen Bedingungen.

Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Weinstein R.L., Kelch R.P., Jenner M.R., Kaplan S.L., Grumbach M.M. (1974)**

Secretion of unconjugated androgens and estrogens by the normal and abnormal human testis before and after human chorionic gonadotropin.

The Journal of Clinical Investigation 53, 1-6

**Wichmann U., Wichmann G., Krause W. (1984)**

Serum levels of testosterone precursors, testosterone and estradiol in 10 animal species.

Experimental and Clinical Endocrinology 83, 283-290

**Wilkens H., Münster W. (1987)**

Venen der Beckenhöhlenorgane.

in: „Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.“

Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (Eds.)

Band III, Verlag Paul Parey, 6. Auflage, p 273



**Wu F.C.W., Swanston I.A., Hargreave T.B., Baird D.T. (1982)**

Human testis does not secrete oestrone sulphate.

Journal of Endocrinology 92, 185-194

**Yamato K., Handa S., Yamakawa T. (1974)**

Purification of arylsulfatase A from boar testis and its activities toward seminolipid and sulfatide.

Journal of Biochemistry 75, 1241-1247

## 9 TABELLENANHANG

Tab. 34: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
*V. auricularis magna* oder *V. cava cranialis* bzw. *V. jugularis externa* bei Ebern in der  
 Altersgruppe 100 Lebenstage (n = 13; 98 - 116 Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 3-100d</b>	0,10	12,70	2,53	0,58
<b>Eber 6-100d</b>	0,51	5,30	3,50	0,72
<b>Eber 1-100d</b>	0,10	10,70	1,29	0,96
<b>Eber 9-100d</b>	0,30	1,13	0,54	0,57
<b>Eber 10-100d</b>	0,18	0,74	1,64	0,32
<b>Eber 11-100d</b>	0,31	7,30	4,66	1,10
<b>Eber 12-100d</b>	0,26	4,54	2,93	1,94
<b>Eber 13-100d</b>	0,39	4,62	18,02	1,10
<b>Eber 2-100d</b>	0,10	36,50	1,57	0,93
<b>Eber 7-100d</b>	0,41	10,78	7,78	0,53
<b>Eber 5-100d</b>	0,75	53,00	7,66	0,44
<b>Eber 8-100d</b>	0,28	3,93	2,18	0,32
<b>Eber 4-100d</b>	0,10	0,19	0,64	1,15

Tab. 35: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
*V. auricularis magna* oder *V. cava cranialis* bzw. *V. jugularis externa* bei Ebern der  
 Altersgruppe 150 - 200 Lebenstage (n = 12; 148 - 218 Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 1-150d</b>	0,21	6,92	1,37	0,72
<b>Eber 2-150d</b>	0,57	5,51	7,05	1,18
<b>Eber 4-150d</b>	0,45	11,80	15,70	2,90
<b>Eber 3-150d</b>	0,32	82,50	9,00	1,33
<b>Eber 5-150d</b>	0,20	0,44	2,30	1,17
<b>Eber A</b>	0,12	33,90	2,48	2,43
<b>Eber 2</b>	0,90	20,64	20,28	2,57
<b>Eber 2-200d</b>	0,12	60,00	16,68	1,65
<b>Eber 3-200d</b>	0,13	50,60	24,08	1,10
<b>Eber 4-200d</b>	0,32	1,49	2,80	4,03
<b>Eber 5-200d</b>	0,83	35,86	7,52	2,03
<b>Eber 6-200d</b>	0,70	9,12	4,00	0,32

Tab. 36: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
*V. auricularis magna* oder *V. cava cranialis* bzw. *V. jugularis externa* bei Ebern der  
 Altersgruppe 250 - 365 Lebenstage (n = 6; 250 - 336 Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 3-250d</b>	0,56	45,24	51,76	0,70
<b>Eber 5-250d</b>	0,44	6,13	6,10	0,53
<b>Eber 1-328d</b>	0,54	56,90	6,75	0,32
<b>Eber 1&gt;200d</b>	0,37	2,07	1,96	0,45
<b>Eber 2-333d</b>	0,66	81,15	7,37	0,46
<b>Eber 2&gt;200d</b>	0,39	4,70	5,53	1,16

Tab. 37: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
V. auricularis magna oder V. cava cranialis bzw. V. jugularis externa bei Ebern der  
Altersgruppe >365 Lebenstagen (n = 6; 582 - 1075 Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 3</b>	0,40	15,57	20,68	1,30
<b>Eber 4</b>	1,31	200,20	42,10	1,82
<b>Eber 5</b>	0,80	109,60	7,48	1,34
<b>Eber „Fritsch“</b>	0,93	78,60	14,74	0,80
<b>Eber 1</b>	1,61	38,08	14,41	2,29
<b>Eber 3-1075d</b>	0,54	46,70	5,63	0,72

Tab. 38: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
A. testicularis bei Ebern der Altersgruppe 100 Lebenstage (n = 8; 99 - 111  
Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 6-100d</b>	0,53	4,89	3,42	0,32
<b>Eber 9-100d</b>	0,61	0,96	0,62	-
<b>Eber 10-100d</b>	0,21	1,22	1,30	0,32
<b>Eber 12-100d</b>	0,29	3,62	3,03	0,83
<b>Eber 13-100d</b>	0,48	4,28	11,43	0,32
<b>Eber 7-100d</b>	0,51	1,85	6,06	0,32
<b>Eber 5-100d</b>	0,75	39,10	5,06	1,10
<b>Eber 8-100d</b>	0,48	7,95	29,42	0,43

Tab. 39: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
A. testicularis bei Ebern der Altersgruppe 150 - 200 Lebenstage (n = 6; 152 - 218  
Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 4-150d</b>	0,58	13,19	19,60	1,24
<b>Eber 1-200d</b>	0,58	131,60	50,10	1,96
<b>Eber 2</b>	2,22	77,80	135,80	7,83
<b>Eber 3-200d</b>	0,11	34,70	13,18	2,48
<b>Eber 4-200d</b>	0,36	2,84	5,44	1,63
<b>Eber 6-200d</b>	0,41	7,10	27,00	0,60

Tab. 40: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
A. testicularis in der Altersgruppe 250 - 365 Lebenstage (n = 5; 249 - 336 Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 4-250d</b>	0,63	43,12	55,52	1,17
<b>Eber 3-250d</b>	0,57	43,46	53,16	0,67
<b>Eber 5-250d</b>	0,59	4,12	3,74	0,32
<b>Eber 1&gt;200d</b>	0,13	2,71	3,87	0,32
<b>Eber 2&gt;200d</b>	0,30	8,33	6,71	1,42

Tab. 41: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
A. testicularis in der Altersgruppe >365 Lebenstage (n = 2; 582 und 995 Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 3</b>	0,47	18,54	24,47	1,02
<b>Eber „Fritsch“</b>	1,03	82,60	17,20	0,90

Tab. 42: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
V. testicularis in der Altersgruppe 100 Lebenstage (n = 6; 98 - 103 Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 3-100d</b>	0,47	37,30	19,05	2,13
<b>Eber 6-100d</b>	1,59	220,80	191,74	3,08
<b>Eber 10-100d</b>	0,45	3,80	28,22	0,48
<b>Eber 12-100d</b>	1,50	37,20	101,98	1,80
<b>Eber 13-100d</b>	1,20	27,30	789,00	1,46
<b>Eber 7-100d</b>	2,88	265,00	260,72	2,46

Tab. 43: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
V. testicularis in der Altersgruppe 150 - 200 Lebenstage (n = 13; 148 - 218  
Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 1-150d</b>	0,21	5,00	1,43	1,53
<b>Eber 2-150d</b>	0,56	48,20	155,80	2,03
<b>Eber 4-150d</b>	1,16	92,00	32,50	3,44
<b>Eber 3-150d</b>	0,75	126,20	135,00	1,96
<b>Eber 5-150d</b>	0,24	1,66	20,19	0,63
<b>Eber A</b>	1,35	146,70	89,00	2,18
<b>Eber 1-200d</b>	3,04	325,80	453,20	12,62
<b>Eber 2</b>	4,43	179,80	208,60	2,77
<b>Eber 2-200d</b>	4,18	9,29	582,00	4,77
<b>Eber 3-200d</b>	5,63	251,20	845,00	4,33
<b>Eber 4-200d</b>	0,62	9,97	42,60	1,45
<b>Eber 5-200d</b>	1,49	176,50	170,40	1,33
<b>Eber 6-200d</b>	0,73	46,70	178,20	0,61

Tab. 44: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
V. testicularis bei Ebern der Altersgruppe 250 - 365 Lebenstagen (n = 4; 250 - 336  
Lebenstagen)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 3-250d</b>	1,56	105,10	524,50	1,83
<b>Eber 5-250d</b>	0,57	5,50	16,94	0,48
<b>Eber 1&gt;200d</b>	1,21	21,68	294,00	1,04
<b>Eber 2&gt;200d</b>	4,02	174,60	393,00	5,57

Tab. 45: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) der  
V. testicularis bei Ebern der Altersgruppe >365 Lebenstagen (n = 4; 582 - 995  
Lebenstage)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Eber 3</b>	2,20	133,60	185,60	3,35
<b>Eber 4</b>	2,22	223,00	118,40	6,20
<b>Eber 5</b>	6,42	883,10	102,65	6,38
<b>Eber „Fritsch“</b>	0,73	91,00	47,90	1,73

Tab. 46: Korrelationen zwischen dem Tialter (98-1075 Lebenstagen) und den Konzentrationen an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron pro Punktionsort

	Vena auricularis/ Vena cava (n=37)	Arteria testicularis (n=20)	Vena testicularis (n=27)
E1	p<0,001 r=0,569	p<0,5 r=0,188	p<0,5 r=0,257
E1S	p<0,01 r=0,472	p<0,5 r=0,359	p<0,1 r=0,345
T	p<0,1 r=0,396	p<0,5 r=0,191	p>0,5 r=0,007
P4	p<0,5 r=0,136	p>0,5 r=0,128	p<0,5 r=0,277

Tab. 47: Mit unpaarem Student's t-Test ermittelte Abhängigkeiten zwischen der peripheren Zirkulation und der Arteria testicularis bezüglich ihrer Gehalte an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron in den Altersgruppen 100, 150 – 200, 250 – 365 und >365 Lebenstagen

Hormone	Lebensalter in Tagen			
	100	150 - 200	250 - 365	>365
Estron	p<0,1	p<0,5	p<0,5	p<0,5
Estronsulfat	p<0,5	p<0,5	p<0,5	p<0,5
Testosteron	p<0,5	p<0,1	p<0,5	p<0,5
Progesteron	p<0,1	p<0,5	p<0,5	p<0,5



Tab. 48: Mit unpaarem Student's t-Test ermittelte Abhängigkeiten zwischen der peripheren Zirkulation und der Vena testicularis bezüglich ihrer Gehalte an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron in den Altersgruppen 100, 150 – 200, 250 – 365 und >365 Lebenstagen

Hormone	Lebensalter in Tagen			
	100	150- 200	250 - 365	>365
Estron	p<0,001	p<0,01	p<0,1	p<0,1
Estronsulfat	p<0,01	p<0,01	p<0,5	p<0,1
Testosteron	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Progesteron	p<0,01	p<0,1	p<0,1	p<0,01

Tab. 49: Mit unpaarem Student's t-Test ermittelte Abhängigkeiten zwischen der Arteria und Vena testicularis bezüglich ihrer Gehalte an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron in den Altersgruppen 100, 150 – 200, 250 – 365 und >365 Lebenstagen

Hormone	Lebensalter in Tagen			
	100	150 - 200	250 - 365	>365
Estron	p<0,001	p<0,1	p<0,1	p<0,5
Estronsulfat	p<0,1	p<0,1	p<0,1	p<0,5
Testosteron	p<0,1	p<0,1	p<0,1	p<0,1
Progesteron	p<0,01	p<0,5	p<0,5	p<0,1

Tab. 50: Mittels Radioimmunoassay ermittelte Steroidhormongehalte (nmol/l) im Seminalplasma geschlechtsreifer Eber (n = 21)

<b>Tier</b>	<b>E1</b>	<b>E1S</b>	<b>T</b>	<b>P4</b>
<b>Paul</b>	1,26	1,77	1,41	0,67
<b>Willie</b>	2,09	9,18	2,10	0,44
<b>Fred I</b>	0,62	3,01	1,68	0,65
<b>Eber 1&gt;250d</b>	0,14	0,19	-	-
<b>Eber 2&gt;250d</b>	0,34	6,42	1,88	0,32
<b>Fred II</b>	10,65	17,70	3,01	0,56
<b>Fesch</b>	0,63	2,19	1,08	0,32
<b>Visir</b>	0,10	3,46	1,10	0,32
<b>Zito</b>	0,33	12,66	1,16	0,32
<b>Fabul</b>	0,21	0,97	0,53	0,32
<b>Frucht</b>	0,15	5,46	0,73	0,32
<b>Flippos</b>	9,00	12,47	0,78	0,32
<b>Stepp</b>	0,14	0,48	0,41	0,32
<b>Renan</b>	0,28	1,46	1,10	0,32
<b>Coop</b>	0,28	4,53	1,09	0,32
<b>Topas</b>	0,31	3,41	1,60	0,32
<b>Fritz</b>	45,35	5,80	8,66	1,09
<b>Müller</b>	0,15	0,38	0,23	0,32
<b>Bertram I</b>	2,09	6,55	1,11	0,51
<b>Bertram II</b>	0,53	2,48	0,64	0,32
<b>HAM-DE</b>	0,72	10,19	4,18	0,32

Tab. 51: Mittels unpaaren Student's t-Test ermittelte Abhängigkeiten bezüglich der Gehalte an Estron, Estronsulfat, Testosteron und Progesteron in Seminalplasma, peripherem Blut der Vena auricularis magna oder Vena cava cranialis bzw. Vena jugularis externa sowie der Arteria und Vena testicularis

Seminalplasma	Peripherie	A. testicularis	V. testicularis
Estron	p<0,5	p<0,5	p<0,5
Estronsulfat	p<0,0001	p<0,0001	p<0,001
Testosteron	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
Progesteron	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001

Tab. 52: Östrogensulfotransferase (OST)-Aktivität in Gewebehomogenaten des Hodens (H) geschlechtsreifer Eber (n = 6), gemessen als %Umwandlung freien Östrons (E1) in die konjugierte Form (E1S) über 60 Minuten Inkubation

Tier	MLW	GLW	0 min	5 min	15 min	30 min	60 min
<b>E1-150d</b>	3,24	10,26	5,15	3,66	4,37	4,67	6,01
<b>E2-150d</b>	3,62	2,88	4,51	4,16	5,32	6,45	6,93
<b>E3-150d</b>	3,67	7,35	3,10	3,11	3,28	4,06	5,79
<b>E1-200d</b>	3,81	3,42	3,36	3,25	3,04	3,79	4,31
<b>E2-200d</b>	2,11	3,18	2,65	3,06	6,47	8,89	3,95
<b>E3-200d</b>	2,40	3,36	3,42	3,07	2,63	1,92	4,50

Tab. 53: Östrogensulfotransferase (OST)-Aktivität in Gewebehomogenaten des Nebenhodens (NH) geschlechtsreifer Eber (n = 6), gemessen als %Umwandlung freien Östrons (E1) in die konjugierte Form (E1S) über 60 Minuten Inkubation

<b>Tier</b>	<b>MLW</b>	<b>GLW</b>	<b>0 min</b>	<b>5 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<b>E1-150d</b>	3,24	2,79	3,00	5,33	7,38	11,28	15,33
<b>E2-150d</b>	3,62	2,91	3,84	4,32	5,55	7,41	7,87
<b>E3-150d</b>	3,67	4,03	2,93	5,45	7,01	9,32	11,80
<b>E1-200d</b>	3,81	2,27	2,14	3,24	4,58	5,55	7,07
<b>E2-200d</b>	2,11	1,91	2,55	3,86	7,22	11,85	8,91
<b>E3-200d</b>	2,40	2,12	3,19	5,70	5,05	7,47	8,47

Tab. 54: Östrogensulfotransferase (OST)-Aktivität in Gewebehomogenaten des Hodens geschlechtreifer Eber (n=3) unter Zugabe des Cofaktors PAPS, gemessen als % Umwandlung freien Östrons (E1) in die konjugierte Form (E1S) über 60 Minuten Inkubation

<b>Tier</b>	<b>MLW</b>	<b>GLW</b>	<b>0 min</b>	<b>5 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<b>E1-200d</b>	3,06	3,84	2,70	3,38	3,97	4,09	4,91
<b>E2-200d</b>	2,52	2,62	2,94	3,27	7,54	5,46	5,34
<b>E3-200d</b>	3,24	5,48	5,47	3,59	4,03	5,20	7,31

Tab. 55: Östrogensulfotransferase (OST)-Aktivität in Gewebehomogenaten des Nebenhodens geschlechtreifer Eber (n=3) unter Zugabe des Cofaktors PAPS, gemessen als % Umwandlung freien Östrons (E1) in die konjugierte Form (E1S) über 60 Minuten Inkubation

<b>Tier</b>	<b>MLW</b>	<b>GLW</b>	<b>0 min</b>	<b>5 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<b>E1-200d</b>	3,06	2,23	5,69	29,22	34,12	23,26	36,71
<b>E2-200d</b>	2,52	1,86	8,50	26,91	50,51	46,54	55,45
<b>E3-200d</b>	3,24	3,40	9,71	31,59	31,77	30,55	40,28

Tab. 56: Arylsulfatasen (ASC)-Aktivität in Gewebehomogenaten des Hodens (H)  
 geschlechtsreifer Eber (n = 6), gemessen als %Umwandlung sulfokonjugierten  
 Östrons (E1S) in die freie Form (E1) über 60 Minuten Inkubation

<b>Tier</b>	<b>MLW</b>	<b>GLW</b>	<b>0 min</b>	<b>5 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<b>E1-150d</b>	2,14	10,42	31,18	84,91	77,79	86,61	88,54
<b>E2-150d</b>	2,38	14,18	21,70	41,00	76,79	74,09	82,98
<b>E3-150d</b>	2,25	9,34	31,51	62,24	82,80	89,64	91,42
<b>E1-200d</b>	2,19	25,80	29,41	63,51	85,75	88,31	89,56
<b>E2-200d</b>	2,33	27,10	32,84	68,06	84,26	89,47	88,75
<b>E3-200d</b>	2,48	25,37	26,97	61,97	80,86	86,47	88,14

Tab. 57: Arylsulfatasen (ASC)-Aktivität in Gewebehomogenaten des Nebenhodens (NH)  
 geschlechtsreifer Eber (n = 6), gemessen als %Umwandlung sulfokonjugierten Östrons  
 (E1S) in die freie Form (E1) über 60 Minuten Inkubation

<b>Tier</b>	<b>MLW</b>	<b>GLW</b>	<b>0 min</b>	<b>5 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<b>E1-150d</b>	2,14	15,36	20,20	23,99	29,69	35,29	45,30
<b>E2-150d</b>	2,38	13,86	13,18	17,55	21,71	21,37	30,99
<b>E3-150d</b>	2,25	8,23	18,45	24,62	31,20	36,75	44,88
<b>E1-200d</b>	2,19	20,60	24,93	29,98	39,51	47,16	50,97
<b>E2-200d</b>	2,33	24,84	25,85	36,94	46,16	55,05	61,28
<b>E3-200d</b>	2,48	16,47	26,53	36,55	38,72	50,28	46,98

## 10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen meinen besonderen Dank aussprechen:

- Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Bernd Hoffmann für die Überlassung des Themas und die stets gewährte freundliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit, auch wenn manchmal nur wenig Zeit übrig war
- Herrn Prof. Dr. Vladimir Dzapov als Leiter der Zweigstelle Oberer Hardthof des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik für die Bereitstellung geeigneter Tiere, sowie
- Herrn Dieter Albrecht, Landwirtschaftsmeister an oben genanntem Institut, für die fachkundige Obhut und Pflege der Eber und die Unterstützung bei der Durchführung der Operationen
- Herrn Dr. Pürstl von der Besamungsstation Griesheim für die freundliche Bereitstellung von 10 Seminalplasma Proben seiner Zuchteber
- Herrn Dr. Klaus Failing vom Institut Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin für die Beratung und Durchführung der Statistik
- Frau Dr. Kerstin Falter, für ihr Engagement bei meiner Einarbeitung in die Methodik der Gewebeinkubationen, sowie die bereitwillige Weitergabe wertvoller Tipps darüberhinaus
- Den technischen Angestellten der KGGA II: Frau Carmen Schumacher für ihr Geschick und Engagement bei den „Hodenpartys“, die oft die Nacht zum Tage werden ließen; Herrn Wilhelm Damm für die praktische Durchführung der HPLC; Frau Margrit Bach und Frau Ingrid Werner, die auch jederzeit ansprechbar waren; Herrn Jürgen Dörr, der wegen mir Schweine mögen mußte und viel Glas zu spülen hatte
- Frau Dr. Paula Carvarho de Papa und Herrn Pio Dengler, die, wie auch Carmen und Willi, den einen oder anderen RIA ansetzen mußten, in dem meine Proben mitliefen
- Frau Dr. Anja Riesenbeck, Frau Dr. Ruth Klein, Frau Dr. Simone Weise, Frau Dr. Christina Wirth, Frau Dr. Paula Papa und Herrn Dr. Gerhard Schuler, die alle in den Ablauf der „Hodenpartys“ integriert waren, vor allem bei den Dingen, zu denen ich an diesen Tagen überhaupt keine Zeit hatte
- den meisten der bereits genannten Personen möchte ich nochmal ausdrücklich für das freundliche, kameradschaftliche Verhalten und das gute Arbeitsklima danken; dieser Dank erstreckt sich auch zu Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Hartwig Bostedt und den Kollegen der KGGA I, ohne deren Mithilfe und Verständnis manches nicht funktioniert hätte

- den „Eberpflegern“ der Außenstelle Schwarzacker, Herrn Roelke und Herrn Nagel (unvergessen), bei denen „meine Haustiere“ stets in guten Händen waren
- Frau Dr. Frauke Hartung, die im Januar 1997 meine Schritte in die richtige Richtung gelenkt hat
- Herrn Günter Mues, der mir trotz Praxisübernahme-Stress immer die notwendigen Freiräume gelassen hat
- last but not least meiner Familie, allen voran meiner Mutter Käthe Rostalski, die mich nicht nur finanziell sondern auch stets mental unterstützt hat, aber auch Birger, Ursel, Philipp und Thomas Rostalski, die immer ein offenes Ohr für meine Nöte hatten, sowie
- meinem Liebsten Clemens Hagen, der oft auf mich warten musste.

In memoriam „Fred“, der mir gezeigt hat, daß Schweine auch nur Menschen sind.

édition scientifique  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

I SBN 3-8359-5017-7



©